UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Desenvolvimento de plasmídeos replicativos artificiais para transformação de *Mycoplasma pulmonis*, *M. capricolum* e *M. mycoïdes* subsp. *mycoïdes*, e dirupção do gene da hemolisina A de *M. pulmonis* por recombinação homóloga.

Caio Mauricio Mendes de Cordova

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Regina Ayr Flório da Cunha

São Paulo
2002

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Desenvolvimento de plasmídeos replicativos artificiais para transformação de *Mycoplasma pulmonis*, *M. capricolum* e *M. mycoïdes* subsp. *mycoïdes*, e dirupção do gene da hemolisina A de *M. pulmonis* por recombinação homóloga.

Caio Mauricio Mendes de Cordova

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:

Profa. Dra. Regina Ayr Flório da Cunha

São Paulo
2002

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Cordova, Caio Mauricio Mendes de

C796d Desenvolvimento de plasmídeos replicativos artificiais para transformação de *Mycoplasma pulmonis*, *M. capricolum* e *M. mycoides* subsp. *mycoides*, e dirupção do gene da hemolisina A de *M. pulmonis* por recombinação homóloga / Caio Mauricio Mendes de Cordova. -- São Paulo, 2002.
133p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Cunha, Regina Ayr Flório da

1. Genética : Microrganismo 2. Microbiologia I. T. II.
Cunha, Regina Ayr Flório da, orientador

576.139 CDD

Caio Mauricio Mendes de Cordova

Desenvolvimento de plasmídeos replicativos artificiais para transformação de *Mycoplasma pulmonis*, *M. capricolum* e *M. mycoïdes* subsp. *mycoïdes*, e dirupção do gene da hemolisina A de *M. pulmonis* por recombinação homóloga.

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Regina Ayr Flório da Cunha
Orientadora/ Presidente

Prof. Assoc. Mário Hyoruki Hirata
1º Examinador

Profa. Dra. Kioko Takei
2º Examinador

Dra. Sandra do Lago Moraes de Ávila
3º Examinador

Dra. Rosângela Verlêngia
4º Examinador

São Paulo, 28 de junho de 2002.

Este trabalho foi realizado no
Laboratório de Imunologia Clínica
da Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo

e no
Centre de Recherche INRA de Bordeaux-Aquitaine
Institut de Biologie Végétale et Moléculaire
Laboratoire IPP
France

Apoio financeiro: bolsa FAPESP
processo 99/07328-2

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Regina Ayr Flório da Cunha, da Disciplina de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela orientação, amizade e pelas oportunidades que me ofereceu durante esta caminhada;

Ao Prof. Dr. Alain Blanchard, da *Université Victor Segalén, Bordeaux 2* e do *Institut National de la Recherche Agronomique, Institut de Biologie Végétale et Moléculaire*, um cientista brilhante e uma pessoa formidável que eu tive oportunidade de conhecer, e que me recebeu de forma magnífica em seu laboratório para a realização de parte do trabalho experimental;

A Eveline Abela, secretária do *INRA*, que nos deu todo seu apoio e simpatia durante nossa estadia em Bordeaux;

A Carole Lartigue, colega de tese em Bordeaux, parceira de muitos momentos;

A Dra. Patricia B. Monteiro, pelas dicas com as clonagens e pela amizade que curiosamente floresceu em pagos distantes de nossa terra natal;

Ao Dr. Walter Macheroni Jr., o *Valtêr* como eles diziam lá, pelas dicas na lida com o DNA e pelo companheirismo na hora de defendermos a nossa pátria;

Ao Dr. Joël Renaudin do *INRA*, pelas discussões e contribuições durante todo o trabalho;

Ao Prof. Dr. Joseph-Marie Bové e a Dra. Monique Garnier do *INRA* pela recepção e pelo suporte irrestrito durante minha estadia em seu instituto;

Ao Dr. François Thiacourt do *CIRAD* de Montpellier, pelo apoio no trabalho com o *cluster mycoides*;

Ao Prof. Assoc. Adalberto Pessoa Jr., a Profa. Assoc. Rosário Domingues Crespo Hirata e a Dra. Rosângela Verlêngia, pelas contribuições inestimáveis durante a banca de qualificação;

A Profa. Dra. Primavera Boreli, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia – Área de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, por todo apoio durante esta etapa;

A Silene Migliorini, grande amiga do Laboratório de Imunologia Clínica da FCF-USP, um anjo da guarda que quebrou muitos galhos durante esta caminhada;

A meus pais, que sempre acreditaram em mim e que sempre me deram todo o apoio necessário;

A Simone, minha companheira incondicional durante todas as jornadas, todos os desafios e todas as aventuras;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho,

Meus sinceros agradecimentos

SUMÁRIO

Resumo 1

Abstract 3

Introdução 5

Objetivos 40

Material e Métodos 41

[1.Cepas bacterianas, plasmídeos e condições de cultura: 41](#)

[1.1.Cepas de micoplasmas: 41](#)

[1.1.1.Condições de cultivo dos micoplasmas: 41](#)

[1.1.2.Isolamento dos micoplasmas por filtração: 42](#)

[1.2.Escherichia coli: 43](#)

[1.3.Plasmídeos: 43](#)

[2.Análise das seqüências das regiões oriC dos mollicutes: 44](#)

[3.Métodos de análise e modificação de DNA: 44](#)

[3.1.Purificação do DNA: 44](#)

[3.1.1.Desproteínização e precipitação com etanol : 44](#)

[3.1.2.Adsorção com resinas de sílica: 45](#)

[3.2.Extração do DNA genômico de micoplasmas para amplificação por PCR: 45](#)

[3.3.Extração do DNA genômico dos micoplasmas para Southern blotting: 46](#)

[3.4.Extração do DNA plasmidial: 46](#)

[3.5.Quantificação de DNA: 47](#)

[3.6.Digestão do DNA com endonucleases de restrição: 47](#)

[3.7.Análise dos fragmentos de restrição: 48](#)

3.8.	Clonagem dos fragmentos de DNA:	48
3.8.1.	Preparação dos vetores:	48
3.8.2.	Preparação dos fragmentos a serem clonados:	49
3.8.3.	Inserção do DNA no vetor:	49
3.8.4.	Transformação de E. coli:	49
3.8.4.1.	Preparação das células competentes:	49
3.8.4.2.	Transformação:	50
3.8.4.3.	Seleção dos clones transformados:	50
3.9.	Transformação dos micoplasmas:	50
3.9.1.	Transformação por polietileno glicol (PEG):	50
3.9.2.	Transformação por eletroporação:	52
3.10.	Amplificação do DNA pela PCR:	52
3.11.	Southern blotting:	55
3.11.1.	Eletroforese e transferência para membrana:	55
3.11.2.	Preparação das sondas:	55
3.11.3.	Hibridação:	56
3.11.4.	Revelação da hibridação:	56
4.	Construção dos plasmídeos artificiais para transformação de micoplasmas:	57
4.1.	Mycoplasma capricolum subsp. capricolum:	57
4.2.	Mycoplasma genitalium:	58
4.3.	Mycoplasma pulmonis:	58
4.3.1.	Clonagem da região oriC:	58
4.3.2.	Redução da região oriC responsável pela replicação autônoma dos plasmídeos artificiais:	59
5.	Construção dos vetores de interrupção para inativação do gene da hemolisina A de M. pulmonis:	60
6.	Avaliação da atividade hemolítica de M. pulmonis:	61
6.1.	Preparação das hemácias:	61
6.2.	Preparação dos micoplasmas:	61
6.3.	Teste de hemólise em tubos:	61

- [1. Identificação dos DnaA boxes na região oriC dos mollicutes: 63](#)
- [2. Construção dos plasmídeos pMCO2 e pMCO2, contendo a região oriC de Mycoplasma capricolum subsp. capricolum: 65](#)
 - [2.1. Transformação de M. capricolum subsp. capricolum com os plasmídeos pMCO2 e pMCO3: 67](#)
 - [2.2. Transformação de M. mycoïdes subsp. mycoïdes variedade LC com o plasmídeo pMCO2: 70](#)
- [3. Construção dos plasmídeos pMGO1 e pMGO2, contendo a região oriC de Mycoplasma genitalium: 72](#)
 - [3.1. Transformação de M. genitalium com os plasmídeos pMGO1 e pMGO2: 73](#)
- [4. Transformação de Mycoplasma pulmonis com plasmídeos contendo a região oriC de Spiroplasma citri: 73](#)
- [5. Construção do plasmídeo pMPO1, contendo a região oriC de Mycoplasma pulmonis: 74](#)
 - [5.1. Transformação de M. pulmonis com o plasmídeo pMPO1: 75](#)
 - [5.2. Verificação do comportamento do plasmídeo pMPO1: 76](#)
- [6. Construção dos plasmídeos pMPO2, pMPO3, pMPO4 e pMPO5, pela redução do fragmento responsável pela replicação autônoma dos plasmídeos em M. pulmonis: 78](#)
 - [6.1. Transformação de M. pulmonis com os plasmídeos contendo a região oriC reduzida: 80](#)
 - [6.2. Verificação da estabilidade dos plasmídeos pMPO1 e pMPO5: 83](#)
- [7. Dirupção do gene da hemolisina A de M. pulmonis com o uso dos plasmídeos replicativos artificiais construídos: 85](#)
 - [7.1. Transformação de M. pulmonis com os vetores pSRT2- \$\Delta\$ hlyA, pMPO1- \$\Delta\$ hlyA e pMPO5- \$\Delta\$ hlyA: 88](#)
 - [7.2. Verificação da integração dos plasmídeos pMPO1- \$\Delta\$ hlyA e pMPO5- \$\Delta\$ hlyA no gene alvo: 88](#)
 - [7.2.1. Southern blotting: 88](#)
 - [7.2.2. Amplificação pela PCR: 94](#)

[7.3 Recuperação de clones de *M. pulmonis* com o gene *hlyA* inativado por integração do plasmídeo pMPO5- \$\Delta\$ *hlyA*, através do uso de sua propriedade de instabilidade: 98](#)

[7.4 Teste de hemólise em tubos para *M. pulmonis*: 100](#)

Discussão 103

Conclusões 111

Referências Bibliográficas 113

AnexoS 131

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árvore filogenética com base na seqüência do RNAr 16S mostrando a relação de 27 espécies de mollicutes com 3 espécies de bactérias Gram positivas, <i>Clostridium innocuum</i> , <i>C. ramosum</i> e <i>Lactobacillus cateforme</i> , assinaladas na figura*. Adaptado de BEHBAHANI et al. (1993), Maniloff (1992), e Weisburg et al. (1989).....	6
Figura 2. Representação esquemática da organização da região em torno do gene <i>dnaA</i> do cromossomo de algumas espécies de mollicutes, em comparação com a região <i>oriC</i> de <i>Bacillus subtilis</i> . Adaptado de Chambaud (2000).....	18
Figura 3. Representação esquemática do fenômeno da recombinação homóloga entre duas fitas de DNA pela resolução de uma Junção de Holliday, do tipo crossing-over (c-d) e non crossing-over (a-b). Adaptado de Lloyd & Low (1996)....	20
Figura 4. Representação esquemática da resolução da Junção de Holliday. A. Ligação do tetrâmero RuvA na junção e formação da configuração planar. B. Ligação dos anéis de hexâmeros RuvB e formação do complexo Junção-RuvAB. As setas indicam o sentido da rotação das moléculas de DNA ao redor do complexo estático RuvAB. C. Configuração do complexo Junção-RuvC e resolução por clivagem das fitas que não sofreram crossing-over. Adaptado de Lloyd & LOW (1996).....	21

Figura 5. Representação esquemática da variação de fase do gene <i>vsa</i> de <i>M. pulmonis</i> , que codifica o antígeno de superfície V-1. Adaptado de Razin et al. (1998).....	28
Figura 6. Árvore filogenética dos micoplasmas pertencentes ao grupo <i>mycoïdes</i> , com base na seqüência do <i>rrnA</i> . Legenda: — distância correspondente a diferença de um nucleotídeo no gene <i>rrnA</i> . Adaptado de Pettersson (Pettersson et al., 1996).	32
Figura 7. Mapa do vetor pSRT2, desenvolvido a partir do plasmídeo pBS por inserção do determinante de resistência à tetraciclina (<i>tetM</i>) no sítio da enzima <i>PstI</i> na região de clonagem múltipla, sob o controle do promotor do gene da espiralina de <i>S. citri</i> (PS).....	43
Figura 8. Representação esquemática da determinação da orientação do fragmento clonado para a construção dos plasmídeos pMCO2 e pMCO3, com as duas combinações de primers utilizadas: <i>tetL</i> + MCAPO1 e <i>tetL</i> + MCAPO2.....	57
Figura 9. Representação esquemática dos DnaA boxes identificados em torno do gene <i>dnaA</i> de <i>M. pulmonis</i> , <i>M. capricolum</i> e <i>M. genitalium</i> , em comparação com a mesma região de <i>S. citri</i> . Os DnaA box com um ou dois nucleotídeos diferentes da seqüência consenso 5'-TTATC(C/A)A(C/A)A-3' são indicados por setas cinzas e brancas, respectivamente. Os DnaA box idênticos à seqüência consenso são indicados por setas pretas. Os números indicam o tamanho em nucleotídeos dos genes <i>dnaA</i> e das regiões intergênicas representadas.....	64
Figura 10. Representação esquemática da região <i>oriC</i> de <i>M. capricolum</i> e o fragmento clonado no vetor pSRT2 para a construção do plasmídeo pMCO2. <i>tetM</i> : gene de resistência à tetraciclina; PS: promotor do gene da espiralina de <i>S. citri</i> , <i>oriC</i> : fragmento da origem de replicação cromossômica de <i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>	66
Figura 11. Mapa do plasmídeo pMCO3. <i>tetM</i> : gene de resistência à tetraciclina; PS: promotor do gene da espiralina de <i>S. citri</i> , <i>oriC</i> : fragmento da origem de replicação cromossômica de <i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>	67
Figura 12. Colônias de <i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i> não transformado em meio sem antibiótico (A) e transformado com o plasmídeo pMCO2 em meio contendo 2 µg/mL de tetraciclina (B), após 5 dias de cultura. Aumento de 40x.....	68

- Figura 13. Eletroforese em gel de agarose a 1% para análise dos produtos de PCR para detecção do gene *tetM* nas culturas de *M. capricolum* (linhas 1-5) transformado com o plasmídeo pMCO2. P: DNA plasmidial; NT: DNA de *M. capricolum* não transformado; C-: controle negativo de reação. M: Marcador de peso molecular Smartladder (Eurogentec). Os números indicam os tamanhos de cada fragmento em pares de base (bp).....69
- Figura 14. Southern blotting utilizando uma sonda *tetM* com DNA de culturas de *M. capricolum* (linhas 1-6) transformado com o plasmídeo pMCO2, digerido com a enzima *HindIII*. P: DNA plasmidial; NT: DNA de *M. capricolum* não transformado; M: Smartladder (Eurogentec).....70
- Figura 15. Southern blotting utilizando uma sonda *oriC*, com DNA de culturas de *M. mycoïdes* subsp. *mycoïdes* LC transformado com o plasmídeo pMCO2 (linhas 3-8), digerido com a enzima *HindIII*. P: DNA plasmidial; NT: DNA de *M. mycoïdes* não transformado.....72
- Figura 16. Mapa dos plasmídeos pMGO1 e pMGO2, construído pela inserção da região *oriC* de *M. genitalium* no sítio *BamHI* do vetor pSRT2. *tetM*: gene de resistência à tetraciclina; PS: promotor do gene da espiralina de *S. citri*.....73
- Figura 17. Mapa do plasmídeo pMPO1, construído pela inserção da região *oriC* de *M. pulmonis* no sítio *BamHI* do vetor pSRT2. *tetM*: gene de resistência à tetraciclina; PS: promotor do gene da espiralina de *S. citri*.....74
- Figura 18. Colônias de *M. pulmonis* não transformado (A) e transformado com o plasmídeo pMPO1 (B), após 5 dias de cultura em meio Hayflick N sólido. Aumento de 40x.....75
- Figura 19. Southern blotting com DNA de culturas de *M. pulmonis* transformado com o plasmídeo pMPO1 (linhas 1-16), após 2 passagens em meio líquido. O DNA foi digerido com *EcoRI* e hibridado com uma sonda *tetM*. NT: DNA de *M. pulmonis* não transformado; P: DNA plasmidial.....76
- Figura 20. Representação esquemática da integração do plasmídeo pMPO1 na região *oriC* do cromossomo de *M. pulmonis* com um único crossing-over. Os números indicam o tamanho dos fragmentos que hibridam com a sonda *oriC*, após digestão do DNA com a enzima *HindIII* (figura não desenhada em escala).....77

- Figura 21. Southern blotting com DNA de duas culturas de *M. pulmonis* transformado com o plasmídeo pMPO1, após 2 (linhas 1 e 3) e 5 (linhas 2 e 4) passagens em meio líquido. O DNA foi digerido com HindIII e hibridado com uma sonda oriC. NT: DNA de *M. pulmonis* não transformado; P: DNA plasmidial.....78
- Figura 22. Representação esquemática da região oriC de *M. pulmonis* e os diferentes plasmídeos construídos neste trabalho (figura não desenhada em escala). O plasmídeo pMPO1 foi construído clonando-se o fragmento de 1,9 kb contendo a região oriC no sítio BamHI do vetor pSRT2. Os plasmídeos pMPO2 e pMPO3 foram construídos clonando-se as regiões de DnaA boxes localizadas nas extremidades 5' e 3' do gene dnaA, respectivamente, no sítio BamHI do vetor pSRT2. O plasmídeo pMPO4 foi construído clonando-se estes dois fragmentos lado a lado no sítio BamHI do vetor pSRT2, e o plasmídeo pMPO5 foi construído clonando-se estes dois fragmentos espaçados pelo tetM no sítio BamHI do vetor pSRT2.....79
- Figura 23. Representação esquemática dos possíveis resultados da integração do plasmídeo pMPO5 na região oriC do cromossomo de *M. pulmonis* com um único crossing-over. Os números indicam o tamanho dos fragmentos que hibridam com uma sonda oriC, após digestão do DNA com a enzima EcoRI (figura não desenhada em escala).....81
- Figura 24. Southern blotting e hibridação de clones de *M. pulmonis* transformados com o plasmídeo pMPO5 (linhas 1-5) após 15 passagens em meio líquido. O DNA foi digerido com EcoRI e hibridado com uma sonda oriC. Linha NT: DNA de *M. pulmonis* não transformado; P: DNA plasmidial.....82
- Figura 25. Eletroforese em gel de agarose a 1% de DNA do plasmídeo pMPO1, extraído de culturas de *M. pulmonis* em 2 e 5 passagens após a transformação com este vetor (linhas 2 e 3), em comparação com o DNA do plasmídeo original (linhas 1). O DNA foi digerido com as enzimas EcoRI, BamHI, e HindIII. M: Smartladder (Eurogenetec).....83
- Figura 26. Representação gráfica da média da percentagem de colônias dos clones transformados com os plasmídeos pMPO1 e pMPO5 que mantiveram a resistência à tetraciclina após 1, 5, 10 e 15 passagens sem pressão seletiva (P).....85

- Figura 27. Representação dos vetores de dirupção pMPO1- Δ hlyA e pMPO5- Δ hlyA construídos, com os sítios de restrição e a orientação dos fragmentos clonados.....87
- Figura 28. Representação esquemática do vetor de dirupção pMPO1- Δ hlyA e sua integração gene da hemolisina A de *M. pulmonis*. Os números indicam o tamanho dos fragmentos HindIII que hibridam com uma sonda hlyA.....89
- Figura 29. Representação esquemática do vetor de dirupção pMPO5- Δ hlyA e sua integração gene da hemolisina A de *M. pulmonis*. Os números indicam o tamanho dos fragmentos HindIII que hibridam com uma sonda hlyA.....90
- Figura 30. Southern blotting com DNA digerido pela enzima HindIII, de culturas de *M. pulmonis* transformadas com a plasmídeo pMPO1- Δ hlyA (linhas 1 a 6) após 10 (A), 20 (B) passagens em meio líquido, usando a sonda hlyA. NT: DNA de *M. pulmonis* não-transformado; P: DNA plasmidial; ndp: DNA plasmidial não digerido.91
- Figura 31. Southern blotting com DNA digerido pela enzima HindIII, de culturas de *M. pulmonis* transformadas com a plasmídeo pMPO5- Δ hlyA (linhas 1 a 6) após 10 (A) e 20 (B) passagens em meio líquido, usando uma sonda hlyA. NT: DNA de *M. pulmonis* não-transformado; P: DNA plasmidial; ndp: DNA plasmidial não digerido.93
- Figura 32. Representação esquemática da integração do vetor de dirupção pMPO1- Δ hlyA no gene da hemolisina A de *M. pulmonis*, e a posição dos primers HEL e OR3 que produzem um fragmento amplificado de 1,2 kb somente se o plasmídeo estiver inserido nesta região. Com a dirupção por esta estratégia, o micoplasma apresenta duas cópias do gene, uma apresentando uma deleção em sua extremidade 3', e outra apresentando uma deleção em sua extremidade 5', pela recombinação do fragmento interno clonado no plasmídeo com o seu gene alvo.. 94
- Figura 33. Representação esquemática da integração do vetor de dirupção pMPO5- Δ hlyA no gene da hemolisina A de *M. pulmonis*, e a posição dos primers OR2 e HER que produzem um fragmento amplificado de 1,05 kb somente se o plasmídeo estiver inserido nesta região.95
- Figura 34. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR de *M. pulmonis* transformado com os plasmídeos pMPO1- Δ hlyA (A, linhas 1-8) e pMPO5-

Δ hlyA (B, linhas 1-6), utilizando os primers OR3 e HEL e os primers OR2 e HER, respectivamente. CN: controle negativo de reação; NT: DNA de *M. pulmonis* não transformado; P: DNA plasmidial; M: Smartladder (Eurogentec) (A) ou 100 bp DNA Ladder (Gibco) (B).....95

Figura 35. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR de *M. pulmonis* transformado com o plasmídeo pMPO1- Δ hlyA (A, linhas 1-10) e pMPO5- Δ hlyA (B, linhas 1-8), utilizando os primers HEL e HER. NT: DNA de *M. pulmonis* não transformado; P: DNA plasmidial; M: 100 bp DNA ladder (Gibco).....96

Figura 36. Digestão dos produtos de PCR para a detecção da integração do vetor de interrupção no gene da hemolisina A em culturas de *M. pulmonis* transformadas com o plasmídeo pMPO5- Δ hlyA (linhas 1-3), utilizando a enzima de restrição BamHI. NT: DNA de *M. pulmonis* não transformado; M: 100 bp DNA ladder (Gibco).97

Figura 37. Digestão dos produtos de PCR obtidos com os primers HEL e HER (linhas 1-3), que produzem um fragmento de 1,05 kb caso o gene da hemolisina A de *M. pulmonis* permaneça íntegro, utilizando a enzima de restrição HinfI. NT: Produto de PCR com DNA de *M. pulmonis* não transformado; M: 100 bp DNA ladder (Gibco).....97

Figura 38. Southern blotting com DNA digerido pela enzima HindIII, de clones de *M. pulmonis* transformados com plasmídeo pMPO5- Δ hlyA (linhas 3 a 7) após 5 passagens em meio líquido sem tetraciclina, usando a sonda hlyA. NT: DNA de *M. pulmonis* não-transformado; P: DNA plasmidial; ndp: DNA plasmidial não digerido.98

Figura 39. PCR com os primers OR2 e HER (a), que produzem um fragmento amplificado de 1,05 kb em caso de integração do vetor pMPO5- Δ hlyA no gene alvo, e HEL e HER (b), que amplificam um fragmento de 1,05 kb com o gene hlyA intacto. As amostras testadas (1-3) são culturas de *M. pulmonis* transformadas com o plasmídeo pMPO5- Δ hlyA submetidas a 15 passagens sem tetraciclina. M: 100 bp DNA ladder (Gibco BRL); NT: DNA de *M. pulmonis* não-transformado; P: plasmídeo pMPO5- Δ hlyA; CN: controle negativo de reação ; NT-P: mistura de 50 ng de DNA de *M. pulmonis* não-transformado e 2 ng de DNA plasmidial, amplificados com os primers OR2 e HER.....99

Figura 40. Curva de atividade hemolítica de células de micoplasma, representada pela diferença entre a D.O. inicial a 600 nm e a D.O. após a incubação (Δ D.O.) de uma suspensão de eritrócitos com diferentes quantidades de micoplasma (definidas em μ g de proteína). A quantidade de eritrócitos lisados ao final da incubação é diretamente proporcional à Δ D.O. resultante. NT P5 : cultura de *M. pulmonis* não transformado com 5 passagens em meio de cultura ; NT P30 : cultura de *M. pulmonis* não transformado com 30 passagens; 7- pMPO5-DhlyA P20: cultura de *M. pulmonis* transformado com o vetor pMPO5- Δ hlyA com 20 passagens após a transformação; 7- pMPO5-DhlyA P30: cultura de *M. pulmonis* transformado com o vetor pMPO5- Δ hlyA em 30 passagens após a transformação.....100

Figura 41. Curva de atividade hemolítica de células de micoplasma, representada pela diferença entre a D.O. inicial a 600 nm e a D.O. após a incubação de uma suspensão de eritrócitos com diferentes quantidades de micoplasma (definidas em μ g de proteína). NT P5 : cultura de *M. pulmonis* não transformado em 5 passagens após o seu isolamento de camundongo infectado ; NT P24 : cultura de *M. pulmonis* não transformado em 24 passagens após o seu isolamento ; 27.22 P24: cultura de *M. pulmonis* transformado com o vetor pMPO5- Δ hlyA em 24 passagens após a transformação.....101

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Relação dos pares de primers utilizados neste trabalho, indicando sua sequência, gene alvo, e temperatura de hibridização utilizada nas reações de amplificação. As seqüências sublinhadas indicam os sítios de restrição adicionados para facilitar a clonagem dos fragmentos amplificados.....53

Tabela II. Média da percentagem de colônias dos clones transformados com os plasmídeos pMPO1 e pMPO5 que mantiveram a resistência à tetraciclina após 1, 5, 10 e 15 passagens sem pressão seletiva (P). SD: desvio padrão.....	84
Tabela III. Resultados das atividades hemolíticas das culturas de <i>M. pulmonis</i> transformadas com o vetor de dirupção pMPO5- Δ hlyA, em 20 (7-pMPO5- Δ hlyA P20) ou 30 passagens após a transformação (7-pMPO5- Δ hlyA P30), ou em 24 passagens após a transformação, selecionadas após 15 passagens sem tetraciclina (27.22 P24). Os testes foram realizados em duplicata. NT P5: cultura de <i>M. pulmonis</i> não transformado com cinco passagens em meio artificial; NT P30: cultura de <i>M. pulmonis</i> não transformado com 30 passagens em meio artificial...	102
Amikam, D., Glaser, G., Razin, S. Mycoplasmas (Mollicutes) have a low number of rRNA genes. J. Bacteriol., Washington, v.158, n.1, p.376-378, 1984.....	113
Artiushin, S., Duvall, M., Minion, F.C. Phylogenetic analysis of mycoplasma strain ISM1499 and its assignment to the <i>Acholeplasma oculi</i> strain cluster. Int. J. Syst. Bacteriol., Washington, v.45, n.1, p.104-109, 1995.....	113
Asai, T., Bates, D.B., Boye, E., Kogoma, T. Are minichromosomes valid model systems for DNA replication control? Lessons learned from <i>Escherichia coli</i> . Mol. Microbiol., Oxford, v.29, n.3, p.671-675, 1998.....	113
Bailey, C.C., Younkins, R., Huang, W.M., Bott, K.F. Characterization of genes encoding topoisomerase IV of <i>Mycoplasma genitalium</i> . Gene, Amsterdam, v.168, n.1, p.77-80, 1996.....	113
Bailey, T., Elkan, C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON INTELLIGENT SYSTEMS FOR MOLECULAR BIOLOGY, 2, Menlo Park, 1994. Proceedings. Menlo Park: AAAI Press, 1994.....	113
Barbeyrac, B., Bebear, C., Taylor-Robinson, J.G. PCR: preparation of DNA from clinical specimens. In: Razin, S., Tully, J.G., eds. Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology. San Diego: Academic Press, 1996. v.2, p.61-64. (Diagnostic procedures).....	113
Barroso, G., Labarere, J. Chromosomal gene transfer in <i>Spiroplasma citri</i> . Science, Washington, v.241, n.4868, p.959-961, 1988.....	114

- Barroso, G., Salvado, J.-C., Labarere, J. Influence of genetic markers and the fusing agent polyethylene glycol on chromosomal transfer in *Spiroplasma citri*. *Curr. Microbiol., Secaucus*, v.20, p.53-56, 1990.....114
- Barry, M.A., Lai, W.C., Johnston, S.A. Protection against mycoplasma infection using expression-library immunization. *Nature, London*, v.377, n.6550, p.632-635, 1995.....114
- Behbahani, N., Blanchard, A., Cassell, G.H., Montagnier, L. Phylogenetic analysis of *Mycoplasma penetrans*, isolated from HIV-infected patients. *FEMS Microbiol. Lett., Amsterdam*, v.109, n.1, p.63-66., 1993.....114
- Bergemann, A.D., Whitley, J.C., Finch, L.R. Homology of mycoplasma plasmid pADB201 and staphylococcal plasmid pE194. *J. Bacteriol., Washington*, v.171, n.1, p.593-595, 1989.....114
- Bhugra, B., Dybvig, K. Identification and characterization of IS1138, a transposable element from *Mycoplasma pulmonis* that belongs to the IS3 family. *Mol. Microbiol., Oxford*, v.7, n.4, p.577-584, 1993.....114
- Bhugra, B., Voelker, L.L., Zou, N., Yu, H., Dybvig, K. Mechanism of antigenic variation in *Mycoplasma pulmonis*: interwoven, site-specific DNA inversions. *Mol. Microbiol., Oxford*, v.18, n.4, p.703-714, 1995.....114
- Birnboim, H.C., Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res., Oxford*, v.7, p.1513-1523, 1979.. 114
- Blanchard, A. *Ureaplasma urealyticum* urease genes; use of a UGA tryptophan codon. *Mol. Microbiol., Oxford*, v.4, n.4, p.669-676, 1990.....114
- Blanchard, A., Crabb, D.M., Dybvig, K., Duffy, L.B., Cassell, G.H. Rapid detection of *tetM* in *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* by PCR: *tetM* confers resistance to tetracycline but not necessarily to doxycycline. *FEMS Microbiol. Lett., Amsterdam*, v.74, n.2/3, p.277-281, 1992.....114
- Bork, P., Ouzounis, C., Casari, G., Schneider, R., Sander, C., Dolan, M., Gilbert, W., Gillevet, P.M. Exploring the *Mycoplasma capricolum* genome: a minimal cell reveals its physiology. *Mol. Microbiol., Oxford*, v.16, n.5, p.955-967, 1995.....115
- Bove, J.M. Molecular features of mollicutes. *Clin. Infect. Dis., Chicago*, v.17, suppl.1, p.S10-S31, 1993.....115

Brown, M.B., Steiner, D.A. Experimental genital mycoplasmosis: time of infection influences pregnancy outcome. <i>Infect. Immun.</i> , Washington, v.64, n.6, p.2315-2321, 1996.....	115
Cao, J., Kapke, P.A., Minion, F.C. Transformation of <i>Mycoplasma gallisepticum</i> with Tn916, Tn4001, and integrative plasmid vectors. <i>J. Bacteriol.</i> , Washington, v.176, n.14, p.4459-4462, 1994.....	115
Cassell, G.H. Derrick Edward Award Lecture. The pathogenic potential of mycoplasmas: <i>Mycoplasma pulmonis</i> as a model. <i>Rev. Infect. Dis.</i> , Chicago, v.4, suppl., p.S18-S34, 1982.....	115
Chambaud, I. Séquençage et analyse du génome de <i>Mycoplasma pulmonis</i> , l'agent étiologique de la Mycoplasmosse Respiratoire Murine. Rennes, 2000. 271p. (Tese de Doutorado - École Nationale Supérieure Agronomique de Rennes - Université de Rennes).....	115
Chambaud, I., Heilig, R., Ferris, S., Barbe, V., Samson, D., Galisson, F., Moszer, I., Dybvig, K., Wroblewski, H., Viari, A., Rocha, E.P., Blanchard, A. The complete genome sequence of the murine respiratory pathogen <i>Mycoplasma pulmonis</i> . <i>Nucleic Acids Res.</i> , Oxford, v.29, n.10, p.2145-2153, 2001.....	115
Cordova, C.M.M., Blanchard, A., Cunha, R.A.F. Higher prevalence of urogenital mycoplasmas in human immunodeficiency virus-positive patients as compared to patients with other sexually transmitted diseases. <i>J. Clin. Lab. Anal.</i> , New York, v.14, n.5, p.246-253, 2000.....	115
Cordova, C.M.M., Cunha, R.A.F. Relevant prevalence of <i>Mycoplasma hominis</i> and <i>Ureaplasma urealyticum</i> serogroups in HIV-1 infected men without urethritis symptoms. <i>Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, São Paulo</i> , v.42, n.4, p.185-188, 2000.	116
Cordova, C.M.M., Cunha, R.A.F. Detecção de <i>Mycoplasma genitalium</i> , <i>M. fermentans</i> e <i>M. penetrans</i> em pacientes com sintomas de uretrite e em indivíduos infectados pelo HIV-1 no Brasil. <i>J. Bras. Patol.</i> , Rio de Janeiro, v.38, n.1, p.119-126, 2002.....	116
Cordova, C.M.M., Takei, K., Rosenthal, C., Miranda, M.A., Vaz, A.J., Cunha, R.A.F. Evaluation of IgG, IgM, and IgA antibodies to <i>Mycoplasma penetrans</i> detected by	

ELISA and immunoblot in HIV-1-infected and STD patients, in Sao Paulo, Brazil.	
Microbes Infect., Paris, v.1, n.13, p.1095-1101, 1999.....	116
Cox, N.R., Davidson, M.K., Davis, J.K., Lindsey, J.R., Cassell, G.H. Natural mycoplasmal infections in isolator-maintained LEW/Tru rats. Lab. Anim. Sci., Cordova, v.38, n.4, p.381-388, 1988.....	116
d'Alencon, E., Petranovic, M., Michel, B., Noirot, P., Aucouturier, A. Copy-choice illegitimate recombination revisited. EMBO J., Oxford, v.13, p.2725-2734, 1994..	116
de Barbeyrac, B., Dupon, M., Rodriguez, R., Renaudin, H., Bebear, C. A Tn1545-like transposon carries the tet(M) gene in tetracycline resistant strains of <i>Bacterioides ureolyticus</i> as well as <i>Ureaplasma urealyticum</i> , but not <i>Neisseria gonorrhoeae</i> . J. Antimicrob. Chemother., Oxford, v.37, p.223-232, 1996.....	116
Dhandayuthapani, S., Rasmussen, W.G., Baseman, J.B. Disruption of gene mg218 of <i>Mycoplasma genitalium</i> through homologous recombination leads to an adherence-deficient phenotype. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Washington, v.96, n.9, p.5227-5232, 1999.....	116
Duret, S., Danet, J.L., Garnier, M., Renaudin, J. Gene disruption through homologous recombination in <i>Spiroplasma citri</i> : an scm1-disrupted motility mutant is pathogenic. J. Bacteriol., Washington, v.181, n.24, p.7449-7456, 1999.....	117
Dybvig, K. Transformation of <i>Acholeplasma laidlawii</i> with streptococcal plasmids pVA868 and pVA920. Plasmid, Orlando, v.21, n.2, p.155-160, 1989.....	117
Dybvig, K. The genetics and basic biology of <i>Mycoplasma pulmonis</i> : how much is actually <i>Acholeplasma</i> ? Plasmid, Orlando, v.30, n.2, p.176-178, 1993.....	117
Dybvig, K., Alderete, J. Transformation of <i>Mycoplasma pulmonis</i> and <i>Mycoplasma hyorhinis</i> : transposition of Tn916 and formation of cointegrate structures. Plasmid, Orlando, v.20, n.1, p.33-41, 1988.....	117
Dybvig, K., Cassell, G.H. Transposition of gram-positive transposon Tn916 in <i>Acholeplasma laidlawii</i> and <i>Mycoplasma pulmonis</i> . Science, Washington, v.235, n.4794, p.1392-1394, 1987.....	117
Dybvig, K., French, C.T., Voelker, L.L. Construction and use of derivatives of transposon Tn4001 that function in <i>Mycoplasma pulmonis</i> and <i>Mycoplasma arthritidis</i> . J. Bacteriol., Washington, v.182, n.15, p.4343-4347, 2000.....	117

Dybvig, K., Gasparich, E., King, K.W. Artificial transformation of Mollicutes via polyethylene glycol- and electroporation- mediated methods. In: RAZIN, S., TULLY, J.G., eds. Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology. San Diego: Academic Press, 1996. v.1, p.179-184. (Molecular characterization).....	117
Dybvig, K., Maniloff, J. Integration and lysogeny by an enveloped mycoplasma virus. J. Gen. Virol., v.64, pt.8, p.1781-1785, 1983.....	117
Dybvig, K., Voelker, L.L. Molecular biology of mycoplasmas. Annu. Rev. Microbiol., Palo Alto, v.50, p.25-57, 1996.....	118
Dybvig, K., Yu, H. Regulation of a restriction and modification system via DNA inversion in <i>Mycoplasma pulmonis</i> . Mol. Microbiol., Oxford, v.12, n.4, p.547-560, 1994.....	118
Erlich, S.D., Bierne, H., d'Alencon, E., Vilette, D., Petranovic, M. Mechanisms of illegitimate recombination. Gene, Amsterdam, v.135, p.161-166, 1993.....	118
Evengard, B., Sandstedt, K., Bolske, G., Feinstein, R., Riesenfelt-Orn, I., Smith, C.I. Intranasal inoculation of <i>Mycoplasma pulmonis</i> in mice with severe combined immunodeficiency (SCID) causes a wasting disease with grave arthritis. Clin. Exp. Immunol., Oxford, v.98, n.3, p.388-394, 1994.....	118
Faulkner, C.B., Simecka, J.W., Davidson, M.K., Davis, J.K., Schoeb, T.R., Lindsey, J.R., Everson, M.P. Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, interleukin 6, and gamma interferon in C3H/HeN and C57BL/6N mice in acute <i>Mycoplasma pulmonis</i> disease. Infect. Immun., Washington, v.63, n.10, p.4084-4090, 1995.....	118
Fisseha, M., Gohlmann, H.W., Herrmann, R., Krause, D.C. Identification and complementation of frameshift mutations associated with loss of cytoadherence in <i>Mycoplasma pneumoniae</i> . J. Bacteriol., Washington, v.181, n.14, p.4404-4410, 1999.....	118
Foissac, X., Saillard, C., Bove, J.M. Random insertion of transposon Tn4001 in the genome of <i>Spiroplasma citri</i> strain GII3. Plasmid, Orlando, v.37, n.1, p.80-86, 1997.	118
Fraser, C.M., Gocayne, J.D., White, O., Adams, M.D., Clayton, R.A., Fleischmann, R.D., Bult, C.J., Kerlavage, A.R., Sutton, G., Kelley, J.M. The minimal gene	

complement of <i>Mycoplasma genitalium</i> . <i>Science</i> , Washington, v.270, n.5235, p.397-403, 1995.....	118
Freund, E.A. Culture media for classic mycoplasmas. In: RAZIN, S., TULLY, G., eds. <i>Methods in mycoplasmaology</i> . San Diego: Academic Press, 1983. v.1, p.127.	119
Frey, J., Cheng, X., Kuhnert, P., Nicolet, J. Identification and characterization of IS1296 in <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC and presence in related mycoplasmas. <i>Gene</i> , Amsterdam, v.160, n.1, p.95-100, 1995.....	119
Frey, J., Nicolet, J. Molecular identification and epidemiology of animal mycoplasmas. <i>Wien Klin. Wochenschr.</i> , Wien, v.109, n.14-15, p.600-603, 1997..	119
Fujita, M.Q., Yoshikawa, H., Ogasawara, N. Structure of the <i>dnaA</i> and <i>DnaA</i> -box region in the <i>Mycoplasma capricolum</i> chromosome: conservation and variations in the course of evolution. <i>Gene</i> , Amsterdam, v.110, n.1, p.17-23, 1992.....	119
Gaurivaud, P., Laigret, F., Garnier, M., Bove, J.M. Fructose utilization and pathogenicity of <i>Spiroplasma citri</i> : characterization of the fructose operon. <i>Gene</i> , Amsterdam, v.252, n.1/2, p.61-69, 2000.....	119
Glass, J.I., Lefkowitz, E.J., Glass, J.S., Heiner, C.R., Chen, E.Y., Cassell, G.H. The complete sequence of the mucosal pathogen <i>Ureaplasma urealyticum</i> . <i>Nature</i> , London, v.407, n.6805, p.757-762, 2000.....	119
Haldenwang, W. G. The sigma factor of <i>Bacillus subtilis</i> . <i>Microbiol. Rev.</i> , Washington, v.59, p.1-30, 1995.....	119
Hanahan, D. Studies on transformation of <i>Escherichia coli</i> with plasmids. <i>J. Mol. Biol.</i> , Sidcup, v.166, n.4, p.557-580, 1983.....	119
Hedreyda, C.T., Lee, K.K., Krause, D.C. Transformation of <i>Mycoplasma pneumoniae</i> with Tn4001 by electroporation. <i>Plasmid</i> , Orlando, v.30, n.2, p.170-175, 1993.....	119
Heijne, v. The signal peptide. <i>J. Membr. Biol.</i> , New York, v.115, p.195-201, 1990.	120
Hilbert, H., Himmelreich, R., Plagens, H., Herrmann, R. Sequence analysis of 56 kb from the genome of the bacterium <i>Mycoplasma pneumoniae</i> comprising the <i>dnaA</i> region, the <i>atp</i> operon and a cluster of ribosomal protein genes. <i>Nucleic Acids Res.</i> , Oxford, v.24, n.4, p.628-639, 1996.....	120

- Himmelreich, R., Hilbert, H., Plagens, H., Pirkl, E., Li, B.C., Herrmann, R. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.*, Oxford, v.24, n.22, p.4420-4449, 1996.....120
- Hu, W.S., Wang, R.Y., Liou, R.S., Shih, J.W., Lo, S.C. Identification of an insertion-sequence-like genetic element in the newly recognized human pathogen *Mycoplasma incognitus*. *Gene*, Amsterdam, v.93, n.1, p.67-72, 1990.....120
- Hutchison, C.A., Peterson, S.N., Gill, S.R., Cline, R.T., White, O., Fraser, C.M., Smith, H.O., Venter, J.C. Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome. *Science*, Washington, v.286, n.5447, p.2165-2169, 1999. 120
- Hyatt, D.R., ter Huurne, A.A.H.M., van der Zeijst, B.A.M., Joens, L.A. Reduced virulence of *Serpulina hyodysenteriae* hemolysin-negative mutants in pigs and their potential to protect pigs against challenge with a virulent strain. *Infect. Immun.*, Washington, v.62, p.2244-2248, 1994.....120
- Jacob, C., Nouzieres, F., Duret, S., Bove, J.M., Renaudin, J. Isolation, characterization, and complementation of a motility mutant of *Spiroplasma citri*. *J. Bacteriol.*, Washington, v.179, n.15, p.4802-4810, 1997.....120
- Jarvill-Taylor, K.J., Minion, F.C. The effect of thiol-active compounds and sterols on the membrane-associated hemolysin of *Mycoplasma pulmonis*. *FEMS Microbiol Lett.*, Amsterdam, v.128, n.2, p.213-218, 1995.....120
- Jensen, J.S., Hansen, H.T., Lind, K. Isolation of *Mycoplasma genitalium* strains from the male urethra. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.34, n.2, p.286-291, 1996.....121
- Kamiyama, T., Saito, M., Nakagawa, M. Effects of *Mycoplasma pulmonis* infection and exposure to nitrogen dioxide on activities of natural killer cells and macrophages of the mouse. *Jikken Dobutsu*, Tokyo, v.40, n.2, p.255-257, 1991..121
- Kapke, P.A., Knudtson, K.L., Minion, F.C. Transformation of Mollicutes with single-stranded Tn4001 DNA. *Plasmid*, Orlando, v.32, n.1, p.85-88, 1994.....121
- King, K.W., Dybvig, K. Plasmid transformation of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* is promoted by high concentrations of polyethylene glycol. *Plasmid*, Orlando, v.26, n.2, p.108-115, 1991.....121
- King, K.W., Dybvig, K. Nucleotide sequence of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* plasmid pKMK1. *Plasmid*, Orlando, v.28, n.1, p.86-91, 1992.....121

King, K. W.; Dybvig, K. Mycoplasmal cloning vectors derived from plasmid pKMK1. <i>Plasmid</i> , Orlando, v.31, p.49-59, 1993.....	121
King, K.W., Dybvig, K. Transformation of <i>Mycoplasma capricolum</i> and examination of DNA restriction modification in <i>M. capricolum</i> and <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> . <i>Plasmid</i> , Orlando, v.31, n.3, p.308-311, 1994.....	121
Kong, F., James, G., Ma, Z., Gordon, S., Bin, W., Gilbert, G.L. Phylogenetic analysis of <i>Ureaplasma urealyticum</i> --support for the establishment of a new species, <i>Ureaplasma parvum</i> . <i>Int. J. Syst. Bacteriol.</i> , Washington, v.49, pt.4, p.1879-1889, 1999.....	121
Krause, D.C., Balish, M.F. Structure, function, and assembly of the terminal organelle of <i>Mycoplasma pneumoniae</i> . <i>FEMS Microbiol Lett.</i> , Amsterdam, v.198, n.1, p.1-7, 2001.....	121
Ladefoged, S.A., Christiansen, G. Sequencing analysis reveals a unique gene organization in the <i>gyrB</i> region of <i>Mycoplasma hominis</i> . <i>J. Bacteriol.</i> , Washington, v.176, n.18, p.5835-5842, 1994.....	122
Lai, W.C., Bennett, M., Pakes, S.P., Murphree, S.S. Potential subunit vaccine against <i>Mycoplasma pulmonis</i> purified by a protective monoclonal antibody. <i>Vaccine</i> , Oxford, v.9, n.3, p.177-84, 1991.....	122
Lai, W.C., Pakes, S.P., Ren, K., Lu, Y.S., Bennett, M. Therapeutic effect of DNA immunization of genetically susceptible mice infected with virulent <i>Mycoplasma pulmonis</i> . <i>J. Immunol.</i> , Bethesda, v.158, n.6, p.2513-2516, 1997.....	122
Lambert, L.C., Trummell, H.Q., Singh, A., Cassell, G.H., Bridges, R.J. <i>Mycoplasma pulmonis</i> inhibits electrogenic ion transport across murine tracheal epithelial cell monolayers. <i>Infect. Immun.</i> , Washington, v.66, n.1, p.272-279, 1998.....	122
Levinson, G., Gutman, G.A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. <i>Mol. Biol. Evol.</i> , Lawrence, v.4, p.203-221, 1987.....	122
Lind, K., Kristensen, G.B. Significance of antibodies to <i>Mycoplasma genitalium</i> in salpingitis. <i>Eur. J. Clin. Microbiol.</i> , Wiesbaden, v.6, n.2, p.205-207, 1987.....	122
Lloyd, R.G., Low, K.B. Homologous recombination. In: Neidhardt, F.C., Curtiss III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M., Umberger, H.E., eds. <i>Escherichia coli</i> and <i>Salmonella</i> : cellular and molecular biology. 2.ed. Washington: ASM Press, 1996. v.2, p.2236-2255.....	122

Lobry, J.R. Origin of replication of <i>Mycoplasma genitalium</i> . <i>Science</i> , Washington, v.272, n.5262, p.745-746, 1996.....	122
Lorenz, A., Just, W., da Silva Cardoso, M., Klotz, G. Electroporation-mediated transfection of <i>Acholeplasma laidlawii</i> with mycoplasma virus L1 and L3 DNA. <i>J. Virol.</i> , Washington, v.62, n.8, p.3050-3052, 1988.....	122
Lucier, T.S., Hu, P.Q., Peterson, S.N., Song, X.Y., Miller, L., Heitzman, K., Bott, K.F., Hutchison THIRD, C.A., Hu, P.C. Construction of an ordered genomic library of <i>Mycoplasma genitalium</i> . <i>Gene</i> , Amsterdam, v.150, n.1, p.27-34, 1994.....	123
Macao, B., Luirink, J., Samuelsson, T. Ffh and FtsY in a <i>Mycoplasma mycoides</i> signal-recognition particle pathway: SRP RNA and M domain of Ffh are not required for stimulation of GTPase activity in vitro. <i>Mol. Microbiol.</i> , Oxford, v.24, n.3, p.523-534, 1997.....	123
Madiraju, M.V., Qin, M.H., Yamamoto, K., Atkinson, M.A., Rajagopalan, M. The <i>dnaA</i> gene region of <i>Mycobacterium avium</i> and the autonomous replication activities of its 5' and 3' flanking regions. <i>Microbiology</i> , Reading, v.145, pt.10, p.2913-2921, 1999.....	123
Mahairas, G.G., Minion, F.C. Transformation of <i>Mycoplasma pulmonis</i> : demonstration of homologous recombination, introduction of cloned genes, and preliminary description of an integrating shuttle system. <i>J. Bacteriol.</i> , Washington, v.171, n.4, p.1775-1780, 1989.....	123
Maniloff, J. <i>Mycoplasma</i> viruses. In: Maniloff, J., McElhaney, R.N., Finch, L.R., Baseman, J.B., eds. <i>Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis</i> . Washington: ASM Press, 1992. v.1, p.41-59.....	123
Maniloff, J. Phylogeny of mycoplasmas. In: Maniloff, J., McElhaney, R.N., Finch, L.R., Baseman, J.B., eds. <i>Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis</i> . Washington: ASM Press, 1992. v.1, p.549-559.....	123
Maniloff, J. The minimal cell genome: "on being the right size". <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> , Washington, v.93, n.19, p.10004-10006, 1996.....	123
Marmur, J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. <i>J. Mol. Biol.</i> , Sidcup, v.3, p.208-218, 1961.....	123

McDonald, D.M., Schoeb, T.R., Lindsey, J.R. Mycoplasma pulmonis infections cause long-lasting potentiation of neurogenic inflammation in the respiratory tract of the rat. J. Clin. Invest., Ann Arbor, v.87, n.3, p.787-799, 1991.....	123
Meng, K.E., Pfister, R.M. Intracellular structures of Mycoplasma pneumoniae revealed after membrane removal. J. Bacteriol., Washington, v.144, n.1, p.390-399, 1980.....	124
Messer, W., Weigel, C. Initiation of chromosome replication. In: Neidhardt, F.C., Curtiss III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M., Umberger, H.E., eds. Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology. 2.ed. Washington: ASM Press, 1996. v.2, p.1579-1601.....	124
Miler, R.V., Kokjohn, T.A. General microbiology of recA: environmental and evolutionary significance. Annu. Rev. Microbiol., Palo Alto, v.44, p.365-394, 1990.	124
Miles, R.J. Catabolism in mollicutes. J. Gen. Microbiol., Reading, v.138, pt.9, p.1773-1783, 1992.....	124
Minion, F.C., Jarvill-Taylor, K. Membrane-associated hemolysin activities in mycoplasmas. FEMS Microbiol. Lett., Amsterdam, v.116, n.1, p.101-106, 1994...	124
Miyata, M., Wang, L., Fukumura, T. Localizing the replication origin region on the physical map of the Mycoplasma capricolum genome. J. Bacteriol., Washington, v.175, n.3, p.655-660, 1993.....	124
Moller, B.R., Taylor-Robinson, D., Furr, P.M. Serological evidence implicating Mycoplasma genitalium in pelvic inflammatory disease. Lancet, London, v.1, n.8386, p.1102-1103, 1984.....	124
Monteiro, P.B., Teixeira, D.C., Palma, R.R., Garnier, M., Bove, J.M., Renaudin, J. Stable transformation of the Xylella fastidiosa citrus variegated chlorosis strain with oriC plasmids. Appl. Environ. Microbiol., Washington, v.67, n.5, p.2263-2269, 2001.	124
Moran, C.P.J., Lang, N., LeGrice, S.F.J., Lee, G., Stevens, M. Nucleotide sequence that signals the initiation of transcription and translation in Bacillus subtilis. Mol. Gen. Genet., Berlin, v.186, p.339-346, 1982.....	125

- Moriya, S., Atlung, T., Hansen, F.G., Yoshikawa, H., Ogasawara, N. Cloning of an autonomously replicating sequence (ars) from the *Bacillus subtilis* chromosome. *Mol. Microbiol.*, Oxford, v.6, n.3, p.309-315, 1992.....125
- Moriya, S., Firshein, W., Yoshikawa, H., Ogasawara, N. Replication of a *Bacillus subtilis* oriC plasmid in vitro. *Mol. Microbiol.*, Oxford, v.12, n.3, p.469-478, 1994.. 125
- Mushegian, A.R., Koonin, E.V. A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Washington, v.93, n.19, p.10268-10273, 1996.....125
- Nocard, E.; Roux, E. R. Le microbe de la peripneumonie. *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, v.12, p.240, 1898.....125
- Norlander, T., Nilsson, L., Rivero, C., Midvedt, T., Lidegran, M., Carlsoo, B., Stierna, P. Effects of experimental *Mycoplasma pulmonis* infection on sensory neuropeptides and airway mucosa in the rat. *Eur. Respir. J.*, Saint Sheffield, v.10, n.10, p.2334-2342, 1997.....125
- Pettersson, B., Leitner, T., Ronaghi, M., Bolske, G., Uhlen, M., Johansson, K.E. Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster as determined by sequence analysis of the 16S rRNA genes from the two rRNA operons. *J. Bacteriol.*, Washington, v.178, n.14, p.4131-4142, 1996.....125
- Qin, M.H., Madiraju, M.V., Rajagopalan, M. Characterization of the functional replication origin of *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene*, Amsterdam, v.233, n.1/2, p.121-130, 1999.....125
- Razin, S. *Mycoplasma* taxonomy and ecology. In: Maniloff, J., McElhaney, R.N., Finch, L.R., Baseman, J.B., eds. *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. Washington: ASM Press, 1992. v.1, p.3-22.....125
- Razin, S., Yogev, D., Naot, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, Washington, v.62, n.4, p.1094-1156, 1998.....126
- Reddy, S.P., Rasmussen, W.G., Baseman, J.B. Isolation and characterization of transposon Tn4001-generated, cytoadherence-deficient transformants of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, Amsterdam, v.15, n.4, p.199-211, 1996.....126
- Renaudin, J., Bove, J.M. Plasmid and viral vectors for cloning and expression in *Spiroplasma citri*. In: Tully, J.G., Razin, S., eds. *Molecular and diagnostic*

procedures in mycoplasmaology. San Diego: Academic Press, 1996. v.1, p.167-178. (Molecular characterization).....	126
Renaudin, J., Marais, A., Verdin, E., Duret, S., Foissac, X., Laigret, F., Bove, J.M. Integrative and free <i>Spiroplasma citri</i> oriC plasmids: expression of the <i>Spiroplasma</i> <i>phoeniceum</i> spiralin in <i>Spiroplasma citri</i> . J. Bacteriol., Washington, v.177, n.10, p.2870-2877, 1995.....	126
Reyrat, J.M., Pelicic, V., Gicquel, B., Rappuoli, R. Counterselectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. Infect. Immun., Washington, v.66, n.9, p.4011-4017, 1998.....	126
Roberts, M.C., Kenny, G.E. Conjugal transfer of transposon Tn916 from <i>Streptococcus faecalis</i> to <i>Mycoplasma hominis</i> . J. Bacteriol., Washington, v.169, n.8, p.3836-3839, 1987.....	126
Ruepp, A., Soppa, J. Fermentative arginine degradation in <i>Halobacterium</i> <i>salinarum</i> (formerly <i>Halobacterium halobium</i>): genes, gene products, and transcripts of the <i>arcRACB</i> gene cluster. J. Bacteriol., Washington, v.178, p.4942-4947, 1996.....	126
Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, Washington, v.239, p.487-491, 1988.....	126
Sano, K., Miyata, M. The <i>gyrB</i> gene lies opposite from the replication origin on the circular chromosome of <i>Mycoplasma capricolum</i> . Gene, Amsterdam, v.151, n.1/2, p.181-183, 1994.....	127
Shine, J., Dalgarno, L. The 3'-terminal sequence of <i>Escherichia coli</i> 16S ribosomal RNA: complementarity to non-sense triplets and ribosome binding sites. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Washington, v.71, p.1342-1346, 1974.....	127
Simeka, J.W., Davis, J.K., Davidson, M.K., Ross, S.E., Stadlander, C.T.K.-H., Cassel, G.H. <i>Mycoplasma</i> diseases of animals. In: Maniloff, J., McElhaney, R.N., Finch, L.R., Baseman, J.B., eds. <i>Mycoplasmas: molecular biology and</i> <i>pathogenesis</i> . Washington: ASM Press, 1992. v.1, p.391-416.....	127
Smith, D.G., Russell, W.C., Ingledew, W.J., Thirkell, D. Hydrolysis of urea by <i>Ureaplasma urealyticum</i> generates a transmembrane potential with resultant ATP synthesis. J. Bacteriol., Washington, v.175, n.11, p.3253-3258, 1993.....	127

Somerson, N.L., Walls, B.E., Chanock, R.M. Hemolysin of <i>Mycoplasma pneumoniae</i> : tentative identification as a peroxide. <i>Science</i> , Washington, v.150, n.693, p.226-228, 1965.....	127
Southern, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. <i>J. Mol. Biol.</i> , Sidcup, v.98, p.503-517, 1975.....	127
Stanley, P., Koronakis, V., Hugues, C. Acylation of <i>Escherichia coli</i> Hemolysin: A Unique Protein Lipidation Mechanism Underlying Toxin Function. <i>Microbiol. Mol. Biol. Rev.</i> , Washington, v.62, n.2, p.309-333, 1998.....	127
Stark, W.M., Boocock, M.R., Sherratt, D.J. Catalysis by site-specific recombinases. <i>Trends Genet.</i> , Amsterdam, v.8, p.423-439, 1992.....	127
Steffen, M.J., Ebersole, J.L. Secretory immune responses to <i>Mycoplasma pulmonis</i> . <i>Infect. Immun.</i> , Washington, v.60, n.2, p.337-344, 1992.....	128
Sugimura, K., Ohno, T., Azuma, I., Yamamoto, K. Polymorphism in genes for the enzyme arginine deiminase among <i>Mycoplasma</i> species. <i>Infect. Immun.</i> , Washington, v.61, n.1, p.329-331, 1993.....	128
Swing, S.P., Davis, J.K., Egan, M.L. In vitro effects of <i>Mycoplasma pulmonis</i> on murine natural killer cell activity. <i>Lab. Anim. Sci.</i> , Cordova, v.45, n.4, p.352-356, 1995.....	128
Taylor, R.R., Varsani, H., Miles, R.J. Alternatives to arginine as energy sources for the non-fermentative <i>Mycoplasma gallinarum</i> . <i>FEMS Microbiol. Lett.</i> , Amsterdam, v.115, n.2/3, p.163-167, 1994.....	128
Taylor-Robinson, D. The Harrison Lecture. The history and role of <i>Mycoplasma genitalium</i> in sexually transmitted diseases. <i>Genitourin. Med.</i> , London, v.71, n.1, p.1-8, 1995.....	128
Taylor-Robinson, D., Furr, P.M. Genital mycoplasma infections. <i>Wien. Klin. Wochenschr.</i> , Wien, v.109, n.14-15, p.578-583, 1997.....	128
Taylor-Robinson, D., Gilroy, C.B., Hay, P.E. Occurrence of <i>Mycoplasma genitalium</i> in different populations and its clinical significance. <i>Clin. Infect. Dis.</i> , Chicago, v.17, suppl.1, p.S66-S68, 1993.....	128
Tully, J.G. Cloning and filtration techniques for mycoplasmas. In: Razin, S., Tully, J.G., eds. <i>Methods in mycoplasmaology</i> . San Diego: Academic Press, 1983. v.1, p.173-177, 1983.....	128

Tully, J.G., Bove, J.M., Laigret, F., Whitcomb, R.F. Revised taxonomy of the class Mollicutes: proposed elevation of a monophylogenetic cluster of arthropod-associated mollicutes to ordinal rank (<i>Entomoplasmatales</i> ord. nov.), with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology (<i>Entomoplasmataceae</i> fam. nov.) from helical species (<i>Spiroplasmataceae</i>), and emended descriptions of the order <i>Mycoplasmatales</i> , family <i>Mycoplasmataceae</i> . <i>Int. J. Syst. Bacteriol.</i> , Washington, v.43, p.378-385, 1993.....	128
Tully, J.G., Taylor-Robinson, D., Cole, R.M., Rose, D.L. A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract. <i>Lancet</i> , London, v.1, n.8233, p.1288-1291, 1981.....	129
Voelker, L.L., Dybvig, K. Gene transfer in <i>Mycoplasma arthritidis</i> : transformation, conjugal transfer of Tn916, and evidence for a restriction system recognizing AGCT. <i>J. Bacteriol.</i> , Washington, v.178, n.20, p.6078-6081, 1996.....	129
Voelker, L.L., Weaver, K.E., Ehle, L.J., Washburn, L.R. Association of lysogenic bacteriophage MAV1 with virulence of <i>Mycoplasma arthritidis</i> . <i>Infect. Immun.</i> , Washington, v.63, n.10, p.4016-4023, 1995.....	129
Wang, X., Lutkenhaus, J. Characterization of the <i>ftsZ</i> gene from <i>Mycoplasma pulmonis</i> , an organism lacking a cell wall. <i>J. Bacteriol.</i> , Washington, v.178, n.8, p.2314-2319, 1996.....	129
Washburn, L.R., Cole, B.C., Gelman, M.I., Ward, J.R. Chronic arthritis of rabbits induced by mycoplasmas. I. Clinical microbiologic, and histologic features. <i>Arthritis Rheum.</i> , New York, v.23, n.7, p.825-836, 1980.....	129
Washburn, L.R., Cole, B.C., Ward, J.R. Chronic arthritis of rabbits induced by mycoplasmas. II. Antibody response and the deposition of immune complexes. <i>Arthritis Rheum.</i> , New York, v.23, n.7, p.837-845, 1980.....	129
Weisburg, W.G., Tully, J.G., Rose, D.L., Petzel, J.P., Oyaizu, H., Yang, D., Mandelco, L., Sechrest, J., Lawrence, T.G., Van Etten, J. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. <i>J. Bacteriol.</i> , Washington, v.171, n.12, p.6455-6467, 1989.....	129
Williams, M.V., Pollack, J.D. A mollicute (mycoplasma) DNA repair enzyme: purification and characterization of uracil-DNA glycosylase. <i>J. Bacteriol.</i> , Washington, v.172, n.6, p.2979-2985, 1990.....	129

Williamson, D.L., Renaudin, J., Bove, J.M. Nucleotide sequence of the <i>Spiroplasma citri</i> fibril protein gene. J. Bacteriol., Washington, v.173, n.14, p.4353-4362, 1991.....	130
Ye, F., Renaudin, J., Bove, J.M., Laigret, F. Cloning and sequencing of the replication origin (oriC) of the <i>Spiroplasma citri</i> chromosome and construction of autonomously replicating artificial plasmids. Curr. Microbiol., Secaucus, v.29, n.1, p.23-29, 1994.....	130
Yee, T.W., Smith, D.W. Pseudomonas chromosomal replication origins: a bacterial class distinct from <i>Escherichia coli</i> -type origins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Washington, v.87, p.1278-1282, 1990.....	130
Zakrzewska-Czerwinska, J., Schrenpf, H. Characterization of an autonomously replicating region from the <i>Streptomyces lividans</i> chromosome. J. Bacteriol., Washington, v.174, n.8, p.2688-2693, 1992.....	130
Zheng, J., McIntosh, M.A. Characterization of IS1221 from <i>Mycoplasma hyorhinis</i> : expression of its putative transposase in <i>Escherichia coli</i> incorporates a ribosomal frameshift mechanism. Mol. Microbiol., Oxford, v.16, n.4, p.669-685, 1995.....	130
Tabela IV. Composição do meio SP-4 modificado (Freund, 1983).....	131
Tabela V. Composição do meio Hayflick N modificado (Freund, 1983).....	131
Tabela VI. Resultados da atividade hemolítica de células de micoplasma, representada pela diferença entre a D.O. inicial e a D.O. após a incubação (Δ D.O. a 600 nm) de uma suspensão de eritrócitos com diferentes quantidades de micoplasma (definidas em μ g de proteína). A quantidade de eritrócitos lisados ao final da incubação é diretamente proporcional à Δ D.O. resultante. NT P5 : cultura de <i>M. pulmonis</i> não transformado com 5 passagens em meio de cultura ; NT P30 : cultura de <i>M. pulmonis</i> não transformado com 30 passagens; 7- pMPO5-DhlyA P20: cultura de <i>M. pulmonis</i> transformado com o vetor pMPO5- Δ hlyA com 20 passagens após a transformação; 7- pMPO5-DhlyA P30: cultura de <i>M. pulmonis</i> transformado com o vetor pMPO5- Δ hlyA em 30 passagens após a transformação.	132
Tabela VII. Resultados da atividade hemolítica de células de micoplasma, representada pela diferença entre a D.O. inicial a 600 nm e a D.O. após a incubação de uma suspensão de eritrócitos com diferentes quantidades de	

micoplasma (definidas em μg de proteína). NT P5 : cultura de *M. pulmonis* não transformado em 5 passagens após o seu isolamento de camundongo infectado ; NT P24 : cultura de *M. pulmonis* não transformado em 24 passagens após o seu isolamento; 27.22 P24: cultura de *M. pulmonis* transformado com o vetor pMPO5- ΔhlyA em 24 passagens após a transformação selecionada após 15 passagens sem tetraciclina.....134

Abreviações

A:	adenina
acetil-CoA:	acetil-coenzima A
ADP:	adenina-difosfato
AIDS:	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SRA:	sequencia replicativa autônoma
ATP:	adenina-trifosfato
bp:	par de bases
BSA:	soroalbumina bovina
C:	citosina
CDS:	sequencia codificante

CN:	controle negativo
CFU:	unidade formadora de colônias
CTP:	citossina-trifosfato
D.O.:	densidade ótica
dATP:	desoxi-adenina-trifosfato
dCTP:	desoxi-citossina-trifosfato
dGTP:	desoxi-guanina-trifosfato
DIG:	digoxigenina
DMSO:	dimetilsulfóxido
DNA:	ácido desoxi-ribonucleico
DTT:	di-tio-treitol
dTTP:	desoxi-timina-trifosfato
dUTP:	desoxi-uridina-trifosfato
EDTA:	ácido etileno-amino-tetra-acético
g:	grama
G:	guanina
GTP:	guanina-trifosfato
IS:	seqüência de inserção
kDa:	kilo Daltons
L:	litro
M:	molar
mg:	miligrama
mL:	mililitro
mm:	milímetro
mM:	milimolar
MRM:	Micoplasmose Respiratória Murina
NDP:	DNA plasmidial não digerido
ng:	nanograma
NT:	DNA de micoplasma não digerido
<i>oriC</i>:	origem de replicação cromossômica
PBS:	salina tamponada fosfatada
PCR:	Reação em Cadeia da Polimerase

PEG:	polietilenoglicol
PPCB:	Pleuropneumonia Contagiosa Bovina
PPCC:	Pleuropneumonia Contagiosa Caprina
PPLO:	organismos semelhantes ao da PPCB
RBS:	sítio de ligação ao ribossomo
RNA:	ácido ribonucléico
RNA_m:	RNA mensageiro
RNA_r:	RNA ribossômico
RNA_t:	RNA transportador
SCID:	imunodeficiência severa combinada
SD:	seqüência de Shine-Dalgarno
SDS:	dodecil-sulfato de sódio
SSC:	solução salina citratada
T:	timina
TAE:	tris-acetato-EDTA
TCA:	ácido tri-carboxílico
tet^R:	resistente a tetraciclina
<i>T_m</i>:	temperatura de desnaturação do DNA
TTP:	timina trifosfato
U:	uracila
U.V.:	luz ultra-violeta
U:	unidade
μL:	microlitro
μM:	micromolar
μg:	micrograma

RESUMO

Os micoplasmas são os menores microrganismos capazes de autoreplicação conhecidos na natureza, responsáveis por uma série de doenças no homem e nos animais, infectando ainda plantas e insetos. Constituem um grande grupo de bactérias, ordenadas em diferentes gêneros na classe *Mollicutes*, cuja principal característica em comum, além do genoma reduzido, é a ausência de parede celular. *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC, responsável pela Pleuropneumonia Contagiosa Bovina, foi o primeiro microrganismo desta classe de bactérias a ser identificado. Esta é uma doença bastante grave, com altas taxas de morbidade e mortalidade. A variedade *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC é responsável principalmente por casos de Pleuropneumonia Contagiosa Caprina, mastite no gado bovino, e ainda artrite em ovinos e caprinos em menor extensão. *M. capricolum* é um patógeno caprino, responsável principalmente por casos de artrite com grande importância econômica na medicina veterinária. *M. pulmonis* é um patógeno de roedores, considerado como o melhor modelo experimental para o estudo das micoplasmoses respiratórias. *M. genitalium*, o menor microrganismo conhecido capaz de se autoreplicar, é um patógeno humano responsável por casos de uretrite não gonocócica, cujo seqüenciamento completo do cromossomo tornou-se um marco na era da genômica. O estudo funcional do genoma destes micoplasmas, para a compreensão de sua biologia e patogenicidade, requer o desenvolvimento de ferramentas genéticas eficientes. No presente trabalho, análises *in silico* das seqüências na região das prováveis origens de replicação cromossômica (*oriC*) destes micoplasmas demonstraram a existência de possíveis DnaA boxes localizados em torno do gene *dnaA*. Estas regiões *oriC* foram caracterizadas funcionalmente após sua clonagem em vetores artificiais e a transformação dos micoplasmas com os plasmídeos recombinantes resultantes. O plasmídeo pMPO1, contendo a região *oriC* de *M. pulmonis*, sofreu integração no cromossomo do micoplasma por recombinação homóloga após poucas passagens

in vitro. A redução desta *oriC* para o fragmento contendo somente os DnaA boxes localizados nas extremidades 5' ou 3' do gene *dnaA* não foi capaz de produzir plasmídeos replicativos em *M. pulmonis*, exceto quando estes dois fragmentos foram clonados no mesmo vetor, espaçados pelo determinante de resistência à tetraciclina *tetM*. Um fragmento interno do gene da hemolisina A (*hlyA*) de *M. pulmonis* foi clonado nestes plasmídeos *oriC*, e os vetores resultantes foram utilizados para transformar o micoplasma. A integração destes vetores por um *crossing-over* com o gene *hlyA*, causando a sua interrupção, foi documentada. Deste modo, estes plasmídeos *oriC* podem vir a se tornar ferramentas genéticas valiosas para o estudo do papel de genes específicos, notadamente aqueles potencialmente envolvidos na patogênese.

ABSTRACT

Development of artificial replicative plasmids for transformation of *Mycoplasma pulmonis*, *M. capricolum* and *M. mycoïdes* subsp. *mycoïdes*, and disruption of the *M. pulmonis* hemolysin A gene by homologous recombination.

Mycoplasmas are the smallest microorganisms capable of self replication known to date, responsible for many diseases in man and animals, infecting also plants and insects. They constitute a large group of bacteria, classified in different genera in the class *Mollicutes*, which main common characteristic, besides the small genome, is the absence of a cell wall. *Mycoplasma mycoïdes* subsp. *mycoïdes* SC, responsible for the Bovine Contagious Pleuropneumonia, was the first microorganism of this class of bacteria to be identified. That is a quite severe disease, with high morbidity and mortality rates. *Mycoplasma mycoïdes* subsp. *mycoïdes* LC is responsible mainly for cases of Caprine Contagious Pleuropneumonia, mastitis in cattle, and also arthritis in goats and sheep in less extension. *M. capricolum* is a pathogen of goats, responsible mainly by cases of arthritis with large economic impact in veterinary medicine. *M. pulmonis* is a rodent pathogen, considered to be the best experimental model for studying respiratory mycoplasmoses. *M. genitalium*, the smallest microorganism capable of self replication, is an human pathogen responsible for cases of non gonococcal urethritis, which complete chromosome sequencing has become a benchmark in the era of genomics. Functional studies of these mycoplasma genomes, for comprehension of their biology and pathogenicity, requires the development of efficient genetic tools. In the present work, *in silico* analysis of sequences of the putative origin of chromosome replication (*oriC*) region of these mycoplasmas demonstrates the existence of putative DnaA boxes located around the *dnaA* gene. These *oriC* regions were functionally characterized after

cloning into artificial vectors and transformation of mycoplasmas with the resulting recombinant plasmids. The plasmid pMPO1, which contains the *M. pulmonis oriC* region, has integrated into the mycoplasma chromosome by homologous recombination after a few *in vitro* passages. Reduction of this *oriC* to the fragment containing only the DnaA boxes located upstream or downstream the *dnaA* gene could not produce plasmids able to replicate in *M. pulmonis*, except when these two fragments were cloned in the same vector, spaced by tetracycline resistance gene *tetM*. An internal fragment of the *M. pulmonis* hemolysine A gene (*hlyA*) was cloned into these *oriC* plasmids, and the resulting vectors were used to transform the mycoplasma. Integration of these disruption vectors by one *crossing-over* with the *hlyA* gene could be documented. Therefore, these *oriC* plasmids may become valuable genetic tools for studying the role of specific genes of mycoplasmas, specially those potentially involved in pathogenesis.

INTRODUÇÃO

1. Os Micoplasmas

Mais de cem anos se passaram desde que Nocard e Roux iniciaram os estudos com um grupo de microrganismos responsáveis por uma doença contagiosa, a pleuropneumonia bovina (NOCARD & ROUX, 1898). Durante os anos que se seguiram, microrganismos semelhantes ao da pleuropneumonia bovina foram sendo isolados de vários hospedeiros, e denominados PPLOs (*Pleuropneumonia-like organisms*). Estes microrganismos, posteriormente chamados de micoplasmas, fazem parte da grande classe dos *Mollicutes*, fenotipicamente distintos das eubactérias pelo tamanho diminuto de seu genoma e pela ausência de parede celular (RAZIN et al., 1998).

O termo micoplasmas tem sido muitas vezes empregado com referência a todos os microrganismos da classe *Mollicutes*, independente do gênero a que pertencem. Com a finalidade de evitar confusões com os microrganismos do gênero *Mycoplasma*, o termo mollicutes vem sendo utilizado como denominação genérica para todos os microrganismos da classe, ficando as denominações micoplasmas, ureaplasmas, acoleplasmas, anaeroplasmas, asteroleplasmas e espiroplasmas restritas aos microrganismos pertencentes aos respectivos gêneros: *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroleplasma*, e *Spiroplasma* (RAZIN, 1992).

As diferentes espécies foram reunidas em grupos filogeneticamente relacionados pela análise da seqüência de seu RNAr 16S, como demonstrado na **figura 1**. Os acoleplasmas e asteroleplasmas foram considerados os primeiros a terem sofrido o processo de evolução degenerativa a partir de ancestrais Gram-positivos, com a perda de genes não essenciais (DYBVIK &

VOELKER, 1996). Os espiroplasmas parecem ter evoluído de uma divisão do grupo dos acoleplasmas. A filogenia e taxonomia destes microrganismos é particularmente confusa no grupo mycoïdes, onde *M. mycoïdes* e *M. capricolum* estão mais próximos dos espiroplasmas do que dos outros grupos aos quais pertencem as demais espécies de *Mycoplasma*.

Figura 1. Árvore filogenética com base na sequência do rRNA 16S mostrando a relação de 27 espécies de mollicutes com 3 espécies de bactérias Gram positivas, *Clostridium innocuum*, *C. ramosum* e *Lactobacillus cateforme*, assinaladas na figura*. Adaptado de BEHBAHANI et al. (1993), MANILOFF (1992), e WEISBURG et al. (1989).

Certas espécies do grupo Mycoïdes foram

reclassificadas em dois novos gêneros: *Entomoplasma* e *Mesoplasma* (TULLY et al., 1993), sendo que, deste modo, até o momento são oito os gêneros reconhecidos na classe *Mollicutes*. Atualmente, a taxonomia das bactérias, incluindo a dos *Mollicutes*, é baseada na combinação de características fenotípicas e dados filogenéticos obtidos de seqüências genômicas parciais, principalmente de regiões conservadas de genes de RNAr (RAZIN, 1992). Entre os critérios relativamente arbitrários utilizados para a definição de uma espécie bacteriana, inclui-se uma similaridade de DNA entre todas as suas cepas de ao menos 70%. Entretanto, existe pouca dúvida que estes critérios serão modificados com a possibilidade de comparação de seqüências de genomas inteiros, ao invés da trabalhosa e não muito exata determinação da homologia genética pelos testes de hibridação de DNA. Já é consenso entre os taxonomistas bacterianos de que as seqüências completas dos genomas formarão a base da filogenia, e por fim, da taxonomia (RAZIN et al., 1998).

Hoje, mais de 150 espécies de mollicutes são conhecidas, número que aumenta a cada ano. Muitas espécies são patogênicas, infectando o homem, animais, plantas e insetos. Ao menos cinco causam doenças no homem: *Mycoplasma pneumoniae* no trato respiratório, e *M. hominis*, *M. genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* e *U. parvum* principalmente no trato urogenital (KONG et al., 1999; RAZIN et al., 1998). Nos animais, as espécies patogênicas, economicamente mais importantes, são *M. mycoides*, *M. capricolum*, *M. agalactiae* e *M. bovis* no gado bovino, *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis* no rebanho suíno, *M. gallisepticum*, *M. meleagridis* e *M. synoviae* nas aves, e *M. pulmonis* e *M. arthritis* em animais de laboratório (FREY & NICOLET, 1997).

2. A Biologia Molecular dos Mollicutes

Nos últimos anos, muitos avanços foram feitos na compreensão dos mecanismos de patogenicidade dos mollicutes, principalmente com relação às suas interações com o sistema imune, a demonstração de sua habilidade de penetrar em diferentes tipos de células, e a possibilidade de certas espécies

desempenharem um papel de cofatores no desenvolvimento da AIDS (RAZIN et al., 1998). Estes fatos, juntamente com o sequenciamento completo dos genomas de várias espécies, atraíram a atenção de vários pesquisadores para a biologia molecular dos molicutes, considerados os menores microrganismos capazes de auto-replicação.

Apesar de diferenças fundamentais entre estes e os demais procariotos, a biologia molecular dos molicutes é bastante convencional em alguns aspectos. Por volta de 1980, a definição da filogenia destes microrganismos ao redor de 1980 teve uma importância fundamental na compreensão de sua biologia (DYBVIK & VOELKER, 1996). Os molicutes evoluíram de bactérias Gram-positivas, provavelmente de um ancestral comum com baixo conteúdo de G+C. De fato, os molicutes compartilham um ancestral comum com organismos como *Bacillus spp.*, *Clostridium spp.*, *Enterococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus spp.* Deste modo, a expressão de genes e outras características genéticas dos molicutes são semelhantes às características destas bactérias Gram-positivas (DYBVIK & VOELKER, 1996).

Por outro lado, pela capacidade limitada de seu genoma, os molicutes não possuem muitas das vias enzimáticas características da maioria das bactérias. Assim, estes microrganismos são extremamente exigentes em suas necessidades nutricionais, possuindo vias de produção de energia relativamente ineficientes. Produzem altos níveis de enzimas catabólicas, como nucleases e proteases, e parasitam outras células, geralmente eucarióticas, em busca de seus nutrientes (DYBVIK & VOELKER, 1996). Entretanto, a maioria dos molicutes pode ser cultivada na ausência de células. Meios definidos foram descritos para algumas espécies, mas a maioria necessita de meios muito ricos, semelhantes aos utilizados em culturas celulares.

Estas limitações metabólicas provavelmente fazem com que uma determinada espécie de molicute seja parasita de uma estreita gama de hospedeiros. Espécies que infectam certo grupo de animais normalmente não são encontradas em outros hospedeiros. Por exemplo, *M. pneumoniae*, que causa a

Pneumonia Atípica Primária no homem não é capaz de causar sintomas com a mesma gravidade em roedores (CASSELL, 1982). Todas estas características tornam os molícutes singularmente interessantes nos estudos de biologia celular e molecular, pois mesmo com estas limitações, são capazes de se replicar de maneira independente e de exercer seu parasitismo, causando doenças que culminam em grandes prejuízos para a agricultura, a pecuária e a saúde humana.

a. Morfologia e Ultraestrutura

A forma predominante das células dos molícutes é esférica, pelo fato de serem envolvidas somente por uma membrana lipídica. Entretanto, muitos molícutes exibem uma variedade morfológica, incluindo formas de garrafa com uma estrutura terminal afilada de tamanhos variados, além de filamentos helicoidais. As formas filamentosas são resultantes de seu modo de reprodução por fissão binária. A habilidade dos molícutes em manter estas morfologias na ausência de uma parede celular rígida sugere a presença de um citoesqueleto nas células (RAZIN et al., 1998). Além disso, algumas espécies de micoplasmas que apresentam células em forma de garrafa são capazes de deslizar em superfícies sólidas. O mecanismo desta motilidade peculiar ainda não é conhecido. Apesar de *M. pneumoniae* apresentar motilidade e comportamento quimiotático, nenhum gene responsável pode ser identificado até o momento, até porque não se sabe ainda quais tipos de genes devem ser procurados (HIMMELREICH et al., 1996).

As espécies do gênero *Spiroplasma* são as únicas a apresentarem uma morfologia helicoidal, com motilidade rotatória. Os espiroplasmas apresentam fibrilas de cerca de 4 nm de diâmetro, com cerca de 59 kD, que provavelmente funcionam como um elemento do citoesqueleto envolvido na morfologia helicoidal e na motilidade deste molícute. O gene desta proteína, a fibrila ou espiralina (*fib*) foi clonado, facilitando a caracterização desta proteína (WILLIAMSON et al., 1991). Outras informações sobre um gene envolvido na motilidade de *Spiroplasma citri* foram obtidas por mutagênese com transposon (JACOB et al., 1997). Um mutante imóvel foi produzido, por inserção

do transposon Tn4001 no gene *smc1*, que aparentemente codifica um polipeptídeo sem homologia significativa com nenhuma proteína conhecida. O gene *smc1* foi recuperado de uma cepa selvagem de *S. citri* e inserido num vetor de clonagem. A transfecção do mutante sem motilidade com este plasmídeo recombinante restaurou o movimento do espiroplasma, confirmando o envolvimento do produto do gene *smc1* neste processo.

Alguns micoplasmas patogênicos, incluindo *M. pneumoniae* e *M. genitalium*, apresentam uma forma de frasco com uma protuberância em forma de ponteira. Estes micoplasmas aderem-se a células eucarióticas através desta estrutura, que serve de organela de adesão. Aparentemente uma estrutura semelhante à um citoesqueleto está envolvida na manutenção da estrutura celular, na sua divisão, na motilidade e na localização apropriada de adesinas (KRAUSE & BALISH, 2001; MENG & PFISTER, 1980). A análise do genoma de *M. pneumoniae* permitiu a identificação e caracterização das principais proteínas do citoesqueleto deste micoplasma. Algumas funcionam como adesinas expostas na superfície da célula, e outras, designadas acessórias, mantêm a distribuição e a disposição das adesinas na membrana (HIMMELREICH et al., 1996).

A multiplicação dos mollicutes é basicamente semelhante ao modo de reprodução de outros procariotos que se dividem por fissão binária. A divisão do citoplasma é sincronizada com a replicação do genoma, resultando na formação de filamentos multinucleados. A transformação dos filamentos em cadeias de formato cocóide ocorre por constrições na membrana celular em posições equidistantes ao longo do filamento (RAZIN et al., 1998). Nas demais bactérias, a formação destes septos é mediada por componentes da parede celular. Ainda não está claro como este processo ocorre em microrganismos que não apresentam parede celular. O sequenciamento do genoma de várias espécies de micoplasmas permitiu a identificação de alguns genes homólogos a genes envolvidos na divisão celular de bactérias que apresentam parede. O achado mais importante foi a presença do gene *ftsZ* nos micoplasmas (BORK et al., 1995; FRASER et al., 1995; HIMMELREICH et al., 1996; WANG &

LUTKENHAUS, 1996), que parece ser bastante conservado, preenchendo um papel essencial na divisão celular dos procariotos. Nas eubactérias, a FtsZ é uma proteína polimerizável com elementos semelhantes à tubulina, localizada no local de septação, formando um anel de constrição entre as células em divisão. Entre os outros genes associados à divisão celular nas eubactérias (*ftsA*, *ftsH*, *ftsI*, *ftsO*, *ftsW* e *ftsY*), o gene *ftsH* foi identificado em *M. pneumoniae* (HIMMELREICH et al., 1996) e *M. capricolum* (BORK et al., 1995), e o gene *ftsY* foi identificado em *M. genitalium* (FRASER et al., 1995), em *M. pneumoniae* (HIMMELREICH et al., 1996) e em *M. mycoides* subsp. *mycoides* (MACAO et al., 1997). A proteína FtsW tem sido sugerida como responsável pelo início da formação do anel de constrição, provavelmente como um alvo na membrana reconhecido pela FtsZ. Sua ausência nos micoplasmas sugere que não é absolutamente essencial para a localização do sítio de divisão, assim como os produtos dos demais genes, que participam do processo de divisão que ocorre após a formação do anel de constrição (WANG & LUTKENHAUS, 1996). Outro aspecto que ainda não está bem esclarecido nos molícutes é o mecanismo de separação dos cromossomos duplicados nas células filhas. A identificação de homólogos dos genes *parC* e *parE* em *M. genitalium* apenas sugere que a topoisomerase IV, capaz de relaxar o DNA superenrolado, foi conservada durante a evolução por seu papel essencial na divisão celular (BAILEY et al., 1996).

b. Estrutura e Organização do Genoma

Os molícutes possuem um cromossomo constituído de DNA circular de fita dupla, que pode variar de 580 a 1.800 kb (RAZIN et al., 1998). O cromossomo de 580 kb do patógeno humano *M. genitalium* é o menor que se tem conhecimento até o momento (LUCIER et al., 1994). O conteúdo de G+C do cromossomo da maioria dos molícutes é de cerca de 35%, sendo 25% o mínimo encontrado (GLASS et al., 2000). As regiões intergênicas são mais ricas em A+T (freqüentemente cerca de 90%) do que as regiões codificantes. Por outro lado, *M. pneumoniae* é uma espécie que possui um conteúdo relativamente alto de G+C (40%). A razão de tal variação no conteúdo de G+C

entre as diversas espécies de molícutes ainda não é conhecida, mas sabe-se que a atividade da enzima uracil-DNA glicosilase, que remove os resíduos uracila do DNA provenientes da deaminação espontânea dos resíduos de citosina ou da incorporação errônea de dUTP durante a replicação do DNA, está ausente em alguns molícutes, e pode estar deficiente em outras espécies (WILLIAMS & POLLACK, 1990).

Apesar de possuírem genomas tão diminutos, alguns molícutes apresentam seqüências de DNA repetidas ao longo do cromossomo. Estas repetições não são cópias dos genes de RNAr, os quais estão em número de 1 ou 2 nos molícutes, em comparação com 5 a 10 cópias na maioria das bactérias (AMIKAM et al., 1984). A maioria destas repetições são elementos de seqüências de inserção (IS), mas outras são homólogas a genes que codificam as principais proteínas de superfície, capazes de promover rearranjos de DNA associados à variação antigênica (DYBVG & VOELKER, 1996). Os elementos repetitivos encontrados no molícutes são homólogos aos membros da família *IS3* de seqüências de inserção. Entretanto, pelo fato de não ter sido demonstrado que estes elementos são capazes de se transpor ao longo do cromossomo, são normalmente designados elementos *IS-like* (DYBVG & VOELKER, 1996). Uma exceção é o *IS1138*, que se transpõe ativamente no cromossomo de *M. pulmonis* (BHUGRA & DYBVG, 1993). Entre os elementos *IS-like* conhecidos incluem-se o *IS1221* de *M. hyorhinis* e de *M. hyopneumoniae* (ZHENG & McINTOSH, 1995), o *IS1296* de *M. mycoides* subsp. *mycoides* (FREY et al., 1995), e um elemento ainda não classificado em *M. fermentans* (HU et al., 1990).

Com exceção dos espiroplasmas, DNA extracromossômico raramente é encontrado nos molícutes. Os poucos plasmídeos isolados até o momento foram encontrados em *M. mycoides* subsp. *mycoides* e em *S. citri*. Estes plasmídeos pADB201 e pKMK1, os únicos isolados e caracterizados no gênero *Mycoplasma*, não codificam nenhum outro produto além dos necessários para a sua replicação (BERGEMANN et al., 1989). Por outro lado, inúmeras formas replicativas de genomas virais (fagos) foram isolados de

Acholeplasma e outras espécies de *Mycoplasma* e *Spiroplasma* (MANILOFF, 1992), como o fago MAV1, encontrado em *M. arthritidis*, um micoplasma que causa artrite em ratos. Cepas contendo o fago MAV1 são significativamente mais virulentas que cepas que não apresentam o fago, sugerindo que o vírus possa codificar algum fator de virulência importante. Todos os vírus de mollicutes conhecidos são constituídos de DNA, e podem ser circulares ou lineares, de fita dupla ou fita simples (VOELKER et al., 1995).

Nos últimos anos, os maiores avanços para a compreensão da biologia dos mollicutes foram obtidos com o sequenciamento completo do genoma de várias espécies. Até o momento, foram publicadas as seqüências completas do genoma de quatro espécies: *Mycoplasma pneumoniae* (HIMMELREICH et al., 1996), *M. genitalium* (FRASER et al., 1995), *Ureaplasma urealyticum* (GLASS et al., 2000), e *M. pulmonis* (CHAMBAUD et al., 2001). O genoma de *M. capricolum* foi o primeiro a ser estudado, mas ao final do projeto apenas cerca de 20% da seqüência havia sido analisada (BORK, 1995). Brevemente é esperada a publicação da seqüência completa dos genomas de *M. gallisepticum*, pelo *Veterinary Medical Research Institute* em Ames, EUA, e de *M. mycoides* subsp. *mycoides*, pelo *National Veterinary Institute* em Uppsala, Suécia.

A análise destes genomas demonstrou que os mollicutes apresentam muitos genes que codificam proteínas com funções catabólicas e de transporte de metabólitos, e poucas proteínas com função anabólica, confirmando as limitações metabólicas destes microrganismos (RAZIN et al., 1998). A maioria dos mollicutes obtém energia através da glicólise, e as espécies que não possuem vias glicolíticas parecem obter energia pela via da arginina dehidrolase (*M. arthritidis* e *M. hominis*), ou do catabolismo da uréia (*Ureaplasma spp.*). De fato, genes sugestivos destas vias alternativas de produção de energia foram encontrados (BLANCHARD, 1990; BORK, 1995; SUGIMURA et al., 1993). Além disso, como esperado pelos perfis bioquímicos, os mollicutes não apresentam genes que codificam enzimas envolvidas na síntese “de novo” das purinas e pirimidinas, e no ciclo do TCA (RAZIN et al.,

1998).

c. Síntese Protéica

A expressão dos genes dos molícutes se parece com a que ocorre na maioria das bactérias Gram-positivas. Os promotores normalmente possuem regiões -10 e -35 semelhantes à sequência bacteriana de consenso para promotores reconhecidos pelo fator sigma σ^A (HALDENWANG, 1995). Em *B. subtilis* e *E. coli*, esta sequência é TTGACA para a região -35, e TATAAT para a região -10 (MORAN et al., 1982). A tradução do RNAm na maioria dos molícutes também assemelha-se à da maioria das bactérias Gram-positivas, exceto para o códon UGA, que codifica o triptofano ao invés de ser reconhecido como *stop-codon*. Este fato faz com que proteínas de molícutes, quando clonadas e expressas em outros microrganismos, sejam produzidas de forma truncada, pelo fim precoce da tradução. *Acholeplasma laidlawii* é o único molícute conhecido que usa o código genético universal (RAZIN et al., 1998).

A maioria dos RNAm dos molícutes possuem sítios de ligação de ribossomo (RBS) similares à sequência de Shine-Dalgarno (SD) das bactérias Gram-positivas, geralmente localizadas de 4 a 10 bases antes do códon de iniciação da transcrição (SHINE & DALGARNO, 1974). A porção 3' do RNAr 16S da maioria dos molícutes tem quatro nucleotídeos a mais do que as bactérias Gram-positivas, necessitando de sequências SD com alta complementaridade ao RNA ribossomal (BOVE, 1993). Este fato pode explicar porque muito poucos vetores de clonagem originários de bactérias Gram-positivas têm sido introduzidos nos micoplasmas com sucesso (DYBVIIG & VOELKER, 1996).

Os molícutes possuem sequências de peptídeo-sinal típicas de eubactérias, que conduzem as proteínas até vias secretórias para o transporte através da membrana (HEIJNE, 1990). Possuem um número muito elevado de lipoproteínas, geralmente aderidas à membrana pelo mosaico lipídico, com a porção protéica voltada para a superfície exterior (DYBVIIG & VOELKER, 1996). Em muitas proteínas de molícutes, após a clivagem do

peptídeo-sinal, o resíduo de cisteína normalmente adjacente é acilado. Outra modificação pós-traducional nos mollicutes é a fosforilação, que pode regular funções como citoaderência, motilidade e divisão celular (DYBVIK & VOELKER, 1996).

d. Metabolismo Energético

Com base na sua habilidade de metabolizar carboidratos, os mollicutes são divididos em fermentativos e não fermentativos. O sequenciamento dos genomas de *M. genitalium* (FRASER et al., 1995) e *M. pneumoniae* (HIMMELREICH et al., 1996) demonstrou que estes micoplasmas possuem todas as enzimas da via Embden-Meyerhof-Parnas, enquanto que a segunda via para o metabolismo de glicose, a das pentoses fosfato, está incompleta. A maioria dos mollicutes não fermentativos utilizam a via da arginina desidrolase para a obtenção de energia. O metabolismo da arginina resulta na produção de ornitina, ATP, CO₂ e amônia (RAZIN et al., 1998). A degradação da arginina gera uma quantidade equimolar de ATP, com o uso de três enzimas: arginina deaminase, ornitina carbamoil transferase e carbamato quinase (RUEPP & SOPPA, 1996). Alguns mollicutes, como *M. agalactiae*, *M. bovis* e *M. genitalium*, não são capazes de metabolizar açúcares nem arginina, mas podem oxidar ácidos orgânicos, como láctico e pirúvico, produzindo acetato e CO₂ (MILES, 1992; TAYLOR et al., 1994). Entretanto, a contribuição desta oxidação para a produção de energia nestes micoplasmas não é clara. Genes do metabolismo do piruvato foram encontrados em algumas espécies como *M. capricolum* (ZHU & PETERKOFISKY, 1996). Outra forma de produção de energia pode ser a geração de ATP a partir de acetil fosfato e ADP pela ação da acetato quinase, ligada à formação de acetil fosfato a partir da acetil-CoA pela acetil-fosfotransferase. Ambas enzimas são comumente encontradas nos mollicutes fermentativos e não fermentativos. A acetil-CoA pode ser produzida por fosforilação oxidativa a partir do piruvato (RAZIN et al., 1998).

A produção de energia pelos ureaplasmas constitui-se um

caso especial. Nenhuma das vias citadas acima foi encontrada nestes microrganismos, e os ureaplasmas são singulares entre os mollicutes, produzindo uma urease bastante potente, necessitando portanto de uréia como substrato para o crescimento (RAZIN et al., 1998). A hidrólise da uréia produz um gradiente químico de amônia equivalente a 80 mV e um potencial eletroquímico de prótons de cerca de 24 mV, resultando na biossíntese “de novo” de ATP. Quando o pH do meio externo alcança cerca de 8,1 devido à liberação da amônia, o pH intracelular aumenta até 8,6, cessando a atividade da urease (SMITH et al., 1993). A geração de ATP é então bloqueada, resultando na abrupta interrupção do crescimento dos ureaplasmas em meios de cultura artificiais (RAZIN et al., 1998). Por outro lado, o pH do trato urogenital normalmente é ácido, próximo aos valores de pH ótimos para o crescimento dos ureaplasmas.

e. Replicação do DNA e Reparo

i. A Origem de Replicação Cromossômica

A origem de replicação do cromossomo (*oriC*) foi teoricamente determinada em algumas espécies de mollicutes. Ela é estruturalmente semelhante à região *oriC* das bactérias Gram-positivas, e contém vários DnaA boxes localizados normalmente nas regiões intergênicas ao redor do gene *dnaA*. São nestes DnaA boxes que a proteína DnaA se liga para iniciar a replicação do DNA (FUJITA et al., 1992). Suas seqüências são similares à seqüência consenso 5'-TTATCCACA-3' (MESSER & WEIGEL, 1996), com uma variação de um ou dois nucleotídeos. Após a ligação da DnaA à *oriC*, esta proteína promove uma abertura parcial da porção de 13 mer desta região rica em AT. Isto permite que a proteína DnaB, a helicase da forquilha de replicação, se ligue ao complexo, na forma de um hexâmero de DnaB combinado com seis monômeros de DnaC. No complexo com DnaC, a atividade de helicase da proteína DnaB está bloqueada. A liberação da DnaC associada com hidrólise de ATP ativa a DnaB. Em seguida, a primase DnaG associa-se ao complexo, garantindo que a replicação do DNA ocorra

somente na região *oriC*, de maneira bi-direcional. Neste estágio, a proteína DnaA não é mais necessária, e pode ser reciclada para ligar-se à uma nova *oriC*. Em seguida, os primers construídos pela DnaG são extendidos pela DNA polimerase III, com a ajuda da DNA girase para relaxar a tensão da fita de DNA super-helicoidal.

A ordem dos genes *rnpA-rpmH-dnaA-dnaN-recF-gyrB*, altamente conservada no cromossomo das eubactérias, tem sido apenas parcialmente mantida nos mollicutes. A falta do gene *recF* é comum em todos os mollicutes testados até o momento. As subunidades A e B da enzima DNA girase (*gyrA* e *gyrB*) são normalmente encontradas em seqüência na região *oriC* dos mollicutes, com exceção de *M. capricolum* (SANO & MIYATA, 1994), *M. hominis* (LADEFOGED & CHRISTIANSEN, 1994) e *M. pulmonis* (CHAMBAUD et al., 2001). Com o sequenciamento dos genomas de *M. genitalium* (FRASER et al., 1995) e *M. pneumoniae* (HIMMELREICH et al., 1996), foi observado que a organização dos genes em torno do gene *dnaA* nestes mollicutes é bastante diferente. Além disso, seqüências semelhantes aos DnaA boxes não puderam ser identificadas nesta região do cromossomo de *M. pneumoniae* (HILBERT et al., 1996). Uma vez que os DnaA boxes são essenciais para a ligação da proteína DnaA e o início da replicação do DNA, eles provavelmente existem, mas talvez com uma seqüência diferente da seqüência consenso (RAZIN et al., 1998), ou ainda localizados em outra região do cromossomo. A representação esquemática da região em torno do gene *dnaA* de algumas espécies de mollicutes é apresentada na **figura 2**, em comparação com a região *oriC* de *B. subtilis*.

Bacillus subtilis **Spiroplasma citri** **Mycoplasma pulmonis** **Mycoplasma capricolum** **Mycoplasma genitalium** **Mycoplasma pneumoniae**

Figura 2. Representação esquemática da organização da região em torno do gene *dnaA* do cromossomo de algumas espécies de mollicutes, em comparação com a região *oriC* de *Bacillus subtilis*. Adaptado de CHAMBAUD (2000).

Em trabalhos pioneiros do grupo de J. Renaudin do *Centre de Recherche INRA de Bordeaux*, a região *oriC* do mollicute *S. citri*, um patógeno de plantas, foi clonada e inserida num vetor não replicativo em células de espiroplasmas. Os plasmídeos recombinantes resultantes mostraram-se capazes de transformar o microrganismo (YE, 1994), de inativar (DURET et al., 1999) e complementar (GAURIVAUD et al., 2000) genes específicos, além de permitir a expressão de proteínas heterólogas no espiroplasma (RENAUDIN, 1995). Aparentemente, os *DnaA boxes* presentes no fragmento da região *oriC* clonada no plasmídeo são

reconhecidos pelas enzimas da célula, permitindo a replicação do DNA plasmidial. Estes experimentos abriram grandes perspectivas para o desenvolvimento de vetores de clonagem para os estudos funcionais dos genes dos mollicutes.

f. Recombinação Genética

O fato de que os micoplasmas, apesar de seu genoma reduzido, são capazes de produzir as enzimas necessárias para seu crescimento, são capazes de escapar da resposta imune do hospedeiro, e freqüentemente produzem infecções crônicas, provavelmente esteja relacionado em grande parte à freqüência com que estes microrganismos são capazes de sofrer rearranjos cromossômicos. Deste modo, diferentes grupos de proteínas podem ser produzidos por um número pequeno de nucleotídeos, tornando a recombinação de DNA uma característica importante da biologia molecular dos micoplasmas. Três tipos de recombinação podem ocorrer nas bactérias: homóloga, sítio específica, e ilegítima. A recombinação homóloga ocorre entre regiões que apresentam grandes homologias de nucleotídeos, e geralmente necessitam da proteína RecA (MILER & KOKJOHN, 1990). A primeira demonstração de recombinação homóloga nos mollicutes foi em uma cepa de *Acholeplasma* (MAHAIRAS & MINION, 1989), primeiramente confundido com *M. pulmonis* (ARTIUSHIN et al., 1995; DYBVIG, 1993), onde um plasmídeo contendo uma região homóloga a um fragmento do cromossomo foi capaz de se integrar no genoma do mollicute. Experimentos semelhantes foram demonstrados também em *M. gallisepticum* (CAO et al., 1994) e *M. genitalium* (DHANDAYUTHAPANI et al., 1999). A recombinação homóloga ocorre nos mollicutes provavelmente por uma via dependente da proteína RecA, mas também pode acontecer por vias alternativas, como demonstrado em *S. citri*, que possui um gene *recA* não funcional (RENAUDIN & BOVE, 1996).

A recombinação homóloga ocorre principalmente pelo mecanismo da chamada Junção de Holliday. As trocas de DNA homólogo entre as moléculas necessitam da quebra e da reunião das fitas de DNA, fato que

normalmente conserva a integridade do cromossomo. A especificidade da recombinação é regulada simplesmente pela complementaridade das fitas simples de cada molécula. Recombinações ilegítimas ou entre regiões com pouca homologia podem ser abortadas neste estágio por enzimas que reconhecem as diferenças no pareamento dos nucleotídeos e desfazem a molécula heteroduplex intermediária. O processamento da Junção de Holliday por clivagem simétrica, chamado resolução, e a religação das moléculas recombinantes, pode ser do tipo *crossing-over* ou não. Quando a resolução é do tipo *crossing-over*, ocorre uma troca entre as extremidades das moléculas de DNA. Alternativamente, as extremidades das moléculas mantêm suas configurações originais, havendo uma troca entre as porções intermediárias dos fragmentos homólogos (LLOYD & LOW, 1996). Uma representação esquemática do fenômeno da recombinação homóloga entre duas fitas de DNA pela resolução de uma Junção de Holliday é ilustrada na **figura 3**.

Figura 3. Representação esquemática do fenômeno da recombinação homóloga entre duas fitas de DNA pela resolução de uma Junção de Holliday, do tipo *crossing-over* (c-d) e *non crossing-over* (a-b). Adaptado de LLOYD & LOW (1996).

A proteína RecA e outras como a RecT são responsáveis pela ligação das fitas simples de DNA para o pareamento das bases homólogas. O

complexo RecBCD expõe a extremidade 3' da fita simples para esta ligação, o que pode ser feito também por outras proteínas como a RecJ em conjunto com RecQ, em cepas RecBCD⁽⁻⁾. Esta fase é chamada de pré-sinapse. Uma vez apresentado o DNA de fita simples à RecA, esta proteína liga-se ao ácido nucléico e forma um filamento de nucleoproteína helicoidal, que vai catalizar o pareamento e a troca das fitas na etapa da recombinação.

Na segunda fase, chamada sinapse, as duas moléculas de DNA são pareadas, num processo catalizado principalmente pela RecA. Em seguida à troca de fitas, na pós-sinapse, RuvAB e RecG catalizam a migração da Junção de Holliday ao longo da molécula de DNA. Um tetrâmero de RuvAB, uma helicase, liga-se e modela a junção em uma configuração planar quadrada, o que faz com que anéis compostos de hexâmeros de RuvB liguem-se nas extremidades das moléculas homólogas. Estas duas extremidades são então rotacionadas em torno do complexo estático RuvAB. O hexâmero RuvB também é responsável pela remoção dos filamentos de RecA. A remoção das junções que unem as duas moléculas de DNA originais é feita pelas proteínas RuvC e RusA, endonucleases que clivam as duas fitas que não sofreram *crossing-over* (LLOYD & LOW, 1996). A resolução da Junção de Holliday é esquematicamente representada na **figura 4**.

Figura 4. Representação esquemática da resolução da Junção de Holliday. **A.**

Ligação do tetrâmero RuvA na junção e formação da configuração planar. **B.** Ligação dos anéis de hexâmeros RuvB e formação do complexo Junção-RuvAB. As setas indicam o sentido da rotação das moléculas de DNA ao redor do complexo estático RuvAB. **C.** Configuração do complexo Junção-RuvC e resolução por clivagem das fitas que não sofreram *crossing-over*. Adaptado de LLOYD & LOW (1996).

A recombinação sítio-específica ocorre em regiões altamente especializadas, e é catalisada por uma recombinase, que reconhece especificamente estas regiões (STARK et al., 1992). O primeiro relato de recombinação genética nos mollicutes foi a integração sítio específica do vírus L2 no cromossomo de *A. laidlawii* (DYBVIG & MANIOFF, 1983). Recombinação sítio específica também ocorre em *S. citri* com diferentes vírus (RENAUDIN & BOVE, 1996). Outros elementos capazes de sofrerem este tipo de recombinação com o DNA do cromossomo dos mollicutes são os transposons. Apesar dos transposons inserirem-se no DNA de maneira aleatória, os eventos de transposição são altamente sítio-específicos. Entre os elementos que se mostraram capazes de sofrer transposição nos mollicutes incluem-se o IS1138 em *M. pulmonis* (BHUGRA & DYBVIG, 1993), e os transposons oriundos de bactérias Gram-positivas Tn916 em *A. laidlawii* (DYBVIG & CASSELL, 1987), em *S. citri* (BOVE, 1993), em *M. pulmonis* (DYBVIG & CASSELL, 1987), em *M. mycoides* (KING & DYBVIG, 1991), em *M. gallisepticum* (CAO et al., 1994), em *M. hominis* (ROBERTS & KENNY, 1987) e em *M. arthritidis* (DYBVIG & VOELKER, 1996), e o transposon Tn4001 em *Acholeplasma spp.* (KAPKE et al., 1994), em *M. gallisepticum* (CAO et al., 1994), em *M. pneumoniae* (HEDREYDA et al., 1993) e em *M. genitalium* (HUTCHISON et al., 1999). Entretanto, estes tipos de transposons não parecem funcionar indistintamente em todas as espécies de mollicutes.

Além disso, *M. pulmonis* apresenta os primeiros mecanismos de inversão de DNA sítio-específicos relatados nos mollicutes. Os eventos que ocorrem no locus *hsd*, que codifica um sistema de restrição e modificação

semelhante ao sistema de tipo I de enterobactérias (DYBVG & YU, 1994), modificam as propriedades do microrganismo, como pode ser evidenciado por sua susceptibilidade à infecção pelo vírus P1. Outro mecanismo de inversão de DNA sítio específico importante ocorre no locus *vsa* de *M. pulmonis*, que codifica antígenos de superfície, resultando em sua variação de fase (BHUGRA et al., 1995). Curiosamente, uma única enzima recombinase foi identificada com o sequenciamento do genoma deste micoplasma (CHAMBAUD et al., 2001), o que sugere que os eventos que ocorrem nestes dois loci são regulados pela mesma enzima. De fato, inversões no locus *hds* e no locus *vsa* não foram ainda observadas independentemente (DYBVG & VOELKER, 1996).

A recombinação ilegítima pode ocorrer entre seqüências com pouca ou nenhuma homologia, e não requer nenhum sítio específico ou a atividade de recombinases (ERLICH et al., 1993). Estes eventos ocorrem normalmente por erros cometidos pelas enzimas que cortam e religam o DNA, como topoisomerasas e nucleases sítio-específicas, ou por erros na replicação do DNA (d'ALENCON et al., 1994; LEVINSON & GUTMAN, 1987). Vetores derivados do plasmídeo pKMK1, isolado de *M. mycoides*, e alguns outros plasmídeos provenientes de estreptococos e mantidos em *A. laidlawii* tendem a sofrer deleções e outros rearranjos, que podem ser devidos à recombinação ilegítima (DYBVG, 1989; KING & DYBVG, 1993). A alta freqüência de variação de tamanho observada em genes de mollicutes que codificam algumas proteínas de superfície provavelmente também é devida a mecanismos de recombinação ilegítima (DYBVG & VOELKER, 1996).

g. Transferência de Material Genético

Pela ausência de parede celular, poder-se-ia esperar que a introdução de material genético exógeno nas células dos mollicutes não fosse um evento difícil de ocorrer. De fato, a troca de DNA cromossômico durante o contato direto entre células de mollicutes (BARROSO & LABARERE, 1988), e a transposição conjugativa espontânea do Tn916 entre *Enterococcus faecalis* e *M. hominis* (ROBERTS & KENNY, 1987) provavelmente é devida à fusão

momentânea das membranas celulares na região de contato. Entretanto, a eficiência da transferência de DNA nestes casos tem sido baixa. Resultados melhores têm sido obtidos na presença de polietilenoglicol (PEG), ou através de eletroporação.

i. Vetores

A identificação da função de um gene pode ser verificada com certeza através de análises envolvendo sua mutação (RAZIN et al., 1998). A grande quantidade de informações obtidas recentemente sobre genes identificados nos mollicutes com base em análise de seqüência torna necessário o desenvolvimento de procedimentos para o estudo funcional destes genes. Experimentos de transfecção em *S. citri* com o vírus SpV1 contendo um inserto com o gene que codifica a adesina P1 de *M. pulmonis* resultaram na expressão deste fragmento no espiroplasma. Entretanto, este sistema é ineficiente, pois ocorre uma rápida perda do fragmento de DNA clonado. Transposons também têm sido utilizados para a transformação de *A. laidlawii* e *M. pulmonis* em mollicutes resistentes a antibióticos utilizando o plasmídeo pAM120, contendo o transposon Tn916 de estreptococos, que confere resistência à tetraciclina pela expressão do gene *tetM* (DYBVG & CASSELL, 1987). Outros transposons têm sido utilizados em várias espécies de mollicutes desde então, como o Tn1545 e o Tn4001 (CAO et al., 1994; de BARBEYRAC et al., 1996; FOISSAC et al., 1997; KAPKE et al., 1994). Os transposons sofrem uma excisão do plasmídeo que os contém, e integram-se no cromossomo do mollicute em sítios aleatórios (FOISSAC et al., 1997; VOELKER & DYBVG, 1996). A mutagênese por transposon é feita pela sua inserção nos genes, causando a inativação da transcrição ou a formação de produtos truncados. Os genes contendo o transposon são então mapeados e identificados, e a prova definitiva de sua função é dada pela complementação do mutante com um gene selvagem. Esta estratégia tem sido aplicada em *M. pneumoniae* (FISSEHA et al., 1999), *M. genitalium* (REDDY et al., 1996) e *S. citri* (JACOB et al., 1997). Entretanto, em muitos casos, estes elementos se transpõem ativamente, mudando de localização

no cromossomo com alta frequência (FOISSAC et al., 1997; KING & DYBVIG, 1991).

Outro tipo de vetor foi construído inserindo-se a região *oriC* de *S. citri* no plasmídeo comercial pBS (Stratagene, La Jolla, Ca, USA), e o plasmídeo recombinante resultante foi introduzido com eficiência nas células do espiroplasma por eletroporação, onde foi capaz de se replicar e manter-se de maneira estável como um elemento extracromossômico (RENAUDIN et al., 1995). Vetores derivados deste plasmídeo mostram-se capazes de inativar genes específicos de *S. citri* (DURET et al., 1999). A grande vantagem destes tipos de plasmídeos replicativos é a possibilidade de dirigir a inserção do vetor em uma região específica do cromossomo. Assim, pode-se evitar interferências pela eventual inserção aleatória do vetor em outros genes do molicute, como pode ocorrer com partículas virais e transposons. Deste modo, também é possível promover a complementação de genes do molicute em cepas mutantes (GAURIVAUD et al., 2000), comprovando de forma definitiva sua função. Vetores derivados do plasmídeo pKMK1 também foram utilizados para a transformação de *M. mycoïdes* e *M. capricolum* (KING & DYBVIG, 1993). Entretanto, tais plasmídeos caracterizam-se por produzirem um número baixo de cópias, não tem sido capazes de transformar outras espécies de molicutes, e a estabilidade dos insertos nestes vetores não parece adequada (DYBVIG & VOELKER, 1996).

ii. Marcadores de Seleção

A maioria dos estudos de transferência de genes nos molicutes tem sido feita utilizando o determinante *tetM* do transposon Tn916, ou o determinante de resistência à gentamicina do transposon Tn4001 como marcadores de seleção. O marcador *tetM* é bastante eficiente pois confere altos níveis de resistência, mesmo quando presente em cópia única (DYBVIG & VOELKER, 1996). A maioria dos molicutes é sensível à tetraciclina, enquanto que a gentamicina pode ser utilizada com sucesso somente em algumas espécies, como *M. galisepticum*, *M. pneumoniae* e

espécies de acleplasmas. Por outro lado, outras espécies como *M. mycoïdes* e *M. pulmonis* são relativamente resistentes a este antibiótico (DYBVG & VOELKER, 1996). Outros marcadores podem ser utilizados para certas espécies, como o determinante de resistência a eritromicina (*erm*) do plasmídeo pAM β 1 em *A. laidlawii* e em *M. mycoïdes* (DYBVG, 1989; KING & DYBVG, 1993). A resistência a compostos tóxicos como o xilitol tem sido utilizada também nos espiroplasmas (BARROSO & LABARERE, 1988; BARROSO et al., 1990). Recentemente, uma modificação no transposon Tn4001, onde o determinante de resistência à gentamicina foi substituído pelo gene de resistência à tetraciclina (*tetM*), mostrou-se funcional em *M. pulmonis* e *M. arthritidis*, e a utilização do determinante de resistência ao cloranfenicol (*cat*) mostrou-se funcional em *M. pulmonis* (DYBVG et al., 2000).

iii. Transformação

A transformação dos mollicutes não parece ser um evento que ocorra naturalmente, mas dois métodos têm sido utilizados rotineiramente para a transformação artificial. O primeiro é feito com o auxílio de PEG, de maneira semelhante ao procedimento utilizado para bactérias Gram-positivas (DYBVG et al., 1996). A transformação mediada por PEG tem sido utilizada para várias espécies, incluindo *A. laidlawii*, *M. pulmonis*, *M. mycoïdes*, *M. capricolum*, *M. gallisepticum*, *M. arthritidis* e *S. citri*. Entretanto, este método é relativamente ineficiente, sendo necessários cerca de 10 μ g de DNA plasmidial para obter uma frequência de 10^{-6} transformantes por CFU (Unidade Formadora de Colônias). Outra metodologia utilizada para a transformação de várias espécies é a eletroporação, como em *A. laidlawii*, *M. gallisepticum*, *S. citri*, *M. pneumoniae* e *M. mycoïdes* (RENAUDIN & BOVE, 1996). Entretanto, provavelmente pelo tamanho reduzido das células, esta metodologia não tem a mesma eficiência nos mollicutes como na maioria das eubactérias. A escolha do método de transformação depende da espécie de mollicute a ser estudada, e ainda do tipo de DNA a ser testado. Por exemplo, *M. pulmonis*

tem sido transformado somente com o uso de PEG, enquanto que *M. pneumoniae* tem sido transformado somente por eletroporação (DYBVIG & VOELKER, 1996). Da mesma forma, a transfecção de *A. laidlawii* com o vírus L1 tem sido realizada de maneira muito mais eficiente com o uso de PEG, enquanto que a transformação deste mesmo mollicute com o vírus L3 tem sido possível somente por eletroporação (LORENZ et al., 1988).

iv. Presença de sistemas de restrição e modificação do DNA

Sistemas de restrição e modificação são muito comuns nos mollicutes, e podem se tornar obstáculos para a transferência de genes. Alguns estudos têm demonstrado que a transformação de *S. citri* com plasmídeos isolados de *E. coli* somente tem sucesso quando a cepa de *E. coli* utilizada possui a metiltransferase de tipo I *EcoK*, o que sugere que a metilação pela *EcoK* é necessária para a proteção do DNA plasmidial com relação ao sistema de restrição de *S. citri* (BOVE, 1993). Deste modo, falhas na transformação de certos mollicutes com determinados vetores podem ser devidas à atividade de enzimas de restrição, como a enzima detectada em *A. laidlawii* cepa JA1 que digere o DNA que apresenta m⁵C, a enzima detectada em *A. laidlawii* cepa K2 que reconhece a sequência GATC, a enzima *SciNI* de *S. citri* que reconhece a sequência GCGC, a enzima *Uur960I* de *U. urealyticum* que reconhece a sequência GCNGC, e as enzimas *MfeI* e *MunI* de *M. fermentans*, que reconhecem a sequência CAATTG (DYBVIG & VOELKER, 1996).

h. Variação Antigênica

Muitos mollicutes apresentam uma alta frequência de variação de antígenos de superfície. Em várias espécies, as taxas de variação podem chegar de 10^{-2} a 10^{-4} por célula a cada geração (DYBVIG & VOELKER, 1996). Mesmo colônias individuais apresentam populações celulares heterogêneas. Deste modo, sempre deve-se considerar a dinâmica de uma população de mollicutes na elaboração e interpretação de uma série de experimentos.

Esta alta variabilidade antigênica nos molicutes normalmente é devida a uma variação de fase de expressão (ON/OFF) dos genes destes antígenos. Diferentes mecanismos são utilizados para a regulação destas variações. Um dos mecanismos mais interessantes de variação de fase é o da família de genes *vsa* de *M. pulmonis*, que codifica a proteína de membrana V-1, implicada como um dos fatores de virulência deste micoplasma. O cromossomo de *M. pulmonis* pode apresentar até sete genes no locus *vsa*, entretanto, somente um é expresso de cada vez (BHUGRA et al., 1995). O gene que é expresso apresenta na região 5' um sítio de ligação ao ribossomo, um códon de iniciação ATG, e uma sequência de peptídeo sinal. Estas características estão ausentes nos genes silenciosos, e a regulação da expressão é feita por uma recombinação onde a porção 3' de um gene previamente silencioso é substituída pela porção 3' de um gene expresso. Estes rearranjos são inversões de DNA sítios específicas entre sequências de 34 bp conservadas em todos os genes *vsa* (figura 5).

Figura 5. Representação esquemática da variação de fase do gene *vsa* de *M. pulmonis*, que codifica o antígeno de superfície V-1. Adaptado de RAZIN et al. (1998).

Outros sistemas de variação de fase conhecidos nos molicutes, regulados por inserções de sequências repetitivas que bloqueiam a expressão, são os da família de genes *vlp* de *M. hyorhinis* e os da família de genes *pMGA* de *M. gallisepticum*, que codificam as principais lipoproteínas de

membrana destes micoplasmas, o gene *vaa* que codifica uma adesina de *M. hominis*, o gene da lipoproteína P78 de *M. fermentans*, o gene da adesina P1 de *M. pneumoniae*, e os da família de genes *vsp* de *M. bovis*, que codificam proteínas de membrana (RAZIN et al., 1998).

Da mesma maneira, quase todos os mollicutes estudados até o momento apresentam mecanismos de variação de tamanho de seus principais antígenos, como as Vips de *M. hyorhinis*, os Vpss de *M. bovis*, o antígeno MBA de *U. urealyticum*, a adesina Vaa e o antígeno Lmp1 de *M. hominis*, os antígenos P1 e P30 de *M. pneumoniae*, e o antígeno V-1 de *M. pulmonis* (RAZIN et al., 1998).

3. *Mycoplasma genitalium* e o Conceito de Célula Mínima

Entre os mollicutes que infectam o homem, *Mycoplasma genitalium* foi um dos últimos a serem descobertos, isolado pela primeira vez em 1981 por TULLY et al. Este mollicute tem sido detectado mais freqüentemente em amostras uretrais de homens com uretrite não-gonocócica, do que em amostras de homens sem esta condição (TAYLOR-ROBINSON & FURR 1997). *M. genitalium* foi também detectado, pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), na uretra de cerca de 20% de homens com doença persistente ou recorrente, seguida de uma agudização do quadro (TAYLOR-ROBINSON, 1995; TAYLOR-ROBINSON & FURR, 1997; TAYLOR-ROBINSON et al., 1993). Neste último estudo, parece claro que o microrganismo tinha persistido desde o episódio inicial de uretrite, até a cronificação da doença, mesmo sob terapia com antibiótico. Aparentemente o microrganismo pode persistir no trato urogenital da mesma maneira que *M. pneumoniae* persiste no trato respiratório, mesmo frente a doses adequadas de antibiótico, às quais os microrganismos são sensíveis *in vitro*. Anticorpos anti-*M. genitalium* foram também mais freqüentemente detectados no soro de homens que tiveram PCR positiva para *M. genitalium*, do que no soro de homens que tiveram PCR negativa (TAYLOR-ROBINSON & FURR, 1997). Apesar de ser um microrganismo extremamente difícil de ser cultivado, *M. genitalium* foi isolado de

homens com uretrite não-gonocócica utilizando-se culturas de células como passagem intermediária, antes da inoculação em meio para micoplasmas (JENSEN et al., 1996). Estes e vários outros achados posteriores foram suficientes para sugerir que *M. genitalium* esteja fortemente associado à uretrite não-gonocócica aguda. Atualmente sua participação neste tipo de infecção não é mais questionada pelos micoplasmologistas, apesar de raros laboratórios apresentarem recursos humanos e condições técnicas adequadas para realizar o diagnóstico desta infecção.

Em mulheres, *M. genitalium* não parece estar associado a vaginose bacteriana. Entretanto, foi detectado, pela técnica da PCR, no trato genital inferior de 7 a 20% de mulheres sob tratamento em clínicas de doenças sexualmente transmissíveis (TAYLOR-ROBINSON, 1995). É possível que *M. genitalium* esteja envolvido em doenças do trato genital superior, com base nos fatos de que, *in vitro*, o microrganismo adere a células epiteliais das trompas de Falópio, e um aumento de quatro vezes ou mais no título de anticorpos anti- *M. genitalium* foi detectado em cerca de um terço de mulheres com doença pélvica inflamatória, sem evidências de infecção por gonococo, clamídia ou *M. hominis* (MOLLER et al., 1984). Entretanto, outros autores discordam desta observação, não encontrando significância nos títulos de anticorpos anti- *M. genitalium* em mulheres com doença pélvica inflamatória (LIND & KRISTENSEN, 1987).

O sequenciamento completo do cromossomo de *M. genitalium* revelou que este microrganismo, membro da classe *Mollicutes*, possui o menor genoma conhecido até o momento, com 580 kb (FRASER et al., 1995). Alguns autores investigaram a hipótese do genoma de *M. genitalium* representar o conjunto mínimo de genes suficientes para a vida de um microrganismo capaz de autoreplicação. MUSHEGIAN & KOONIN (1996), comparando o genoma deste micoplasma com o de *Haemophilus influenzae*, identificaram 240 genes em comum. Adicionando 22 genes relacionados a vias metabólicas essenciais não identificados nestes microrganismos, e subtraindo 6 genes redundantes e específicos de parasitas, os autores chegaram ao número de 256 genes, que classificaram como sendo o número mínimo aproximado de genes necessários

para o funcionamento de uma célula. Entretanto, *M. genitalium* ainda contém o dobro deste número de genes. MANILOFF (1996) sugere que esta diferença é provavelmente um reflexo da comparação entre um genoma mínimo produzido por bilhões de anos de evolução, e um conjunto mínimo de genes produzidos por um computador. Outros autores tentaram determinar o número mínimo de genes essenciais através de experimentos de mutagênese com *M. genitalium* (HUTCHISON et al., 1999). Entretanto, ao definir um número mínimo de genes essenciais, fica claro que deve-se considerar o meio em que o microrganismo se encontra. Estas análises só foram possíveis com o sequenciamento completo dos genomas bacterianos. O sequenciamento do genoma de *M. genitalium* tornou-se uma marca na era da genômica. Sem dúvida, no futuro, a disponibilidade de metodologias para a realização de estudos funcionais dos genes deste micoplasma em particular, trará ainda uma grande quantidade de informações sobre a biologia e patogenicidade dos microrganismos.

4. O Grupo Mycoïdes

O chamado grupo *Mycoplasma mycoïdes* é constituído de seis espécies ou subespécies de micoplasmas filogeneticamente muito relacionados. São microrganismos patogênicos de grande interesse na medicina veterinária, infectando principalmente o gado bovino, ovino e caprino (FREY & NICOLET, 1997). As espécies de micoplasmas classificadas neste grupo são *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*, *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*, *M. mycoïdes* subsp. *capri*, *M. mycoïdes* subsp. *mycoïdes* variedade LC (*large colony type*), *M. mycoïdes* subsp. *mycoïdes* variedade SC (*small colony type*) e *Mycoplasma* sp. cepa PG50. A análise dos genes de RNAr 16S destes micoplasmas revela uma diferença de poucos nucleotídeos entre a maioria dos alelos (PETTERSSON et al., 1996), conforme ilustrado na **figura 6**.

Figura 6. Árvore filogenética dos micoplasmas pertencentes ao grupo mycoïdes, com base na seqüência do *rrnA*. Legenda: — distância correspondente a diferença de um nucleotídeo no gene *rrnA*. Adaptado de PETTERSSON (PETTERSSON et al., 1996).

A espécie de micoplasma deste grupo melhor conhecida é *M. mycoïdes* subsp. *mycoïdes* SC, agente da Pleuropneumonia Contagiosa Bovina (PPCB), doença conhecida desde o século XVIII, notificada nos trabalhos de NOCARD & ROUX (1898). A PPCB é uma das doenças mais sérias que pode acometer os animais, chegando a índices de 100% de morbidade e 50% de mortalidade. Esta doença foi praticamente erradicada da Europa, Austrália e América do Norte, mas ainda persiste em alguns países em desenvolvimento, principalmente na África (SIMEKA et al., 1992). Nos caprinos e ovinos ocorre uma manifestação grave muito semelhante, a Pleuropneumonia Contagiosa Caprina (PPCC), causada principalmente por *M. mycoïdes* subsp. *mycoïdes* LC e *M.*

mycoïdes subsp. *capri*, com morbidade de até 100%, e mortalidade de 60 a 100% (SIMEKA et al., 1992). *M. mycoïdes* subsp. *mycoïdes* LC e diferentes subespécies de *M. capricolum* podem ser ainda responsáveis por mastite no gado bovino. Entretanto, a manifestação mais grave da infecção por *M. capricolum* é artrite em ovinos e caprinos, que pode ser causada também por *M. mycoïdes* subsp. *mycoïdes* em menor extensão. A doença pode ser tão severa que muitos animais preferem ficar parados em pé por longos períodos, ou se chegam a deitar, são incapazes de se levantar.

O sequenciamento completo do genoma de *M. mycoïdes* subsp. *mycoïdes* SC foi iniciado e está em vias de ser concluído pela importância das doenças causadas por este grupo de micoplasmas. O genoma de *M. capricolum* foi sequenciado parcialmente (BORK et al., 1995), mas espera-se que o trabalho seja retomado em breve. A disponibilidade de sistemas eficientes de análise funcional de genes é um passo essencial para o estudo dos mecanismos de patogenicidade destes micoplasmas. A definição de genes ou produtos de genes implicados na patogênese poderá facilitar enormemente o desenvolvimento de vacinas contra estes microrganismos.

5. *Mycoplasma pulmonis*

A principal doença causada por *M. pulmonis* é a Micoplasmose Respiratória Murina (MRM), cuja expressão é marcadamente influenciada por uma variedade de fatores inerentes ao ambiente, ao hospedeiro e ao microrganismo. Pode causar morbidade e mortalidade significantes, especialmente em animais utilizados em estudos de longa duração, ou animais com infecção subclínica exacerbada por procedimentos experimentais (SIMEKA et al., 1992). Entretanto, o impacto mais significativo da infecção por *M. pulmonis* pode dever-se à sua interferência na interpretação dos resultados experimentais obtidos. Por exemplo, a infecção por *M. pulmonis* pode alterar a função ciliar, a cinética celular (LAMBERT

et al., 1998), a inflamação neurogênica (McDONALD et al., 1991; NORLANDER et al., 1997), a atividade das células NK (KAMIYAMA et al., 1991; SWING et al., 1995), e a resposta imune local e sistêmica (SIMEKA et al., 1992; STEFFEN & EBERSOLE, 1992), com indução da produção de várias interleucinas (FAULKNER et al., 1995). O esforço para reduzir a infecção dos animais de laboratório por *M. pulmonis* obteve certo sucesso, porém não foi capaz de eliminá-la. Estudos de prevalência, da década de 80, ainda mostravam taxas de 5-20% em biotérios controlados (SIMEKA et al., 1992). Apesar de não haver relatos de estudos em larga escala nos últimos anos, alguns achados demonstram que a infecção por *M. pulmonis* ainda persiste em biotérios bem controlados (COX et al., 1988).

M. pulmonis tem também sido isolado, bem como *M. arthritidis*, do trato urogenital de ratos e camundongos, enquanto *M. muris* tem sido isolado somente de camundongos (SIMEKA et al., 1992). Uma importante consequência desta infecção é a redução da procriação, podendo chegar a 50 % (CASSELL, 1982). Como é freqüentemente observado na MRM, quase não há correlação entre os sinais clínicos e as alterações patológicas nas lesões. Um dos fatos mais inusitados da infecção genital é a falta de uniformidade das lesões observadas em animais da mesma idade e de um mesmo grupo. Muitos animais naturalmente infectados apresentam colonização do trato genital inferior, enquanto somente uns poucos apresentam colonização do trato superior. Estes achados sugerem que complexas interações parasita-hospedeiro acabem por permitir que um micoplasma comensal do trato genital inferior invada o trato superior somente em certas circunstâncias (SIMEKA et al., 1992).

M. pulmonis pode também estar associado à artrite em ratos e camundongos. Apesar de ser menos supurativa, assemelha-se aos estágios crônicos do processo causado por *M. arthritidis*, o agente mais comum neste sítio (SIMEKA et al., 1992). A severidade da doença pode variar com o tempo, e a inoculação endovenosa dos microrganismos pode causar uma tendossinovite moderada, cuja gravidade pode ainda variar de acordo com a linhagem de rato utilizada (SIMEKA et al., 1992). Inoculação destes agentes nas articulações do pescoço de coelhos pode produzir artrite semelhante à observada em

camundongos, com inflamação aguda à crônica (WASHBURN et al., 1980). A doença pode durar meses, com detecção de imunocomplexos nos tecidos das articulações por imunofluorescência (WASHBURN et al., 1980; WASHBURN et al., 1980). A inoculação intranasal de *M. pulmonis* em camundongos com imunodeficiência severa combinada (SCID) pode ainda causar artrite grave, constituindo-se um bom modelo para o estudo da artrite em pacientes humanos imunodeficientes (EVENGARD et al., 1994).

a. Infecção experimental com *M. pulmonis*

Além da infecção de camundongos com SCID, a MRM por *M. pulmonis* é considerada um excelente modelo de infecção por *M. pneumoniae* no homem. Estas duas doenças apresentam evolução semelhante, com os mesmos sinais clínicos e histopatológicos. Por outro lado, a avaliação da infecção de camundongos por *M. pneumoniae* é bastante limitada, pois não apresenta as mesmas características da infecção humana (CASSELL, 1982). Da mesma maneira, a infecção por *M. pulmonis* em ratos constitui-se num excelente modelo de infecção intra-uterina. Sua evolução é bastante semelhante à infecção da mulher por *Ureaplasma urealyticum*. De fato, *M. pulmonis* é capaz de atravessar a barreira placentária, e a fisiologia da gravidez nos ratos é bem conhecida (BROWN & STEINER, 1996). Deste modo, a infecção experimental com *M. pulmonis* torna-se um modelo privilegiado para o estudo das doenças causadas por mollicutes no homem.

b. Vacinas contra *M. pulmonis*

Testes clássicos de vacinação contra *M. pulmonis* têm sido realizados, entretanto os resultados obtidos não tem sido animadores. A imunização com células de micoplasma atenuadas confere uma resistência apenas parcial à doença, além de que os animais podem se tornar portadores assintomáticos e disseminar o microrganismo (CHAMBAUD, 2000). Uma proteção parcial pode ser também conferida por imunização passiva, utilizando inclusive certos anticorpos monoclonais. Antígenos purificados com estes anticorpos monoclonais também foram capazes de induzir certa proteção (LAI

et al., 1991).

Estratégias com vacinas de DNA também tem sido aplicadas induzindo uma proteção efetiva (BARRY et al., 1995). Anticorpos foram utilizados para selecionar clones de uma biblioteca genômica de *M. pulmonis* que codificam os antígenos correspondentes, subclonados em um vetor de expressão em eucariotos. Estes antígenos foram capazes de induzir uma proteção forte à MRM, porém não completa (LAI et al., 1997). Uma vacina que seja capaz de imunizar completamente ratos e camundongos contra a infecção por *M. pulmonis* ainda não foi encontrada. O estudo de produtos de genes responsáveis pela patogenicidade dos micoplasmas provavelmente abrirá novas perspectivas para o desenvolvimento de vacinas. Estes achados podem ter também reflexos na medicina humana, pela avaliação dos modelos experimentais de infecção utilizando *M. pulmonis*.

c. O genoma de *M. pulmonis*

O genoma de *M. pulmonis* é marcadamente diferente dos genomas dos outros micoplasmas sequenciados, como *M. pneumoniae* e *M. genitalium*. Apresenta entrancados sistemas de inversão de DNA sítio-específicos, gerando populações de células com alta frequência de mudança fenotípica (DYBVIK & YU, 1994). *M. pulmonis* parece ter sido geneticamente originado de *M. pneumoniae* e *M. genitalium* há centenas de milhares, senão milhões de anos. Genes evolutivamente conservados divergiram significativamente, e muitos genes de *M. pulmonis* não têm análogos em outras espécies de micoplasmas. Entre eles destacam-se várias lipases, proteínas envolvidas no transporte, os genes do locus *hsd*, e várias lipoproteínas de membrana. Além disso, vários genes considerados como componentes essenciais de uma célula mínima (MUSHEGIAN & KOONIN, 1996), não foram identificados em *M. pulmonis*, como por exemplo a enzima fosfofuroquinase, as proteínas de choque térmico GroES e GroEL, e a enzima uridina quinase (CHAMBAUD, 2000).

O tamanho do genoma de *M. pulmonis* é 964 kb, 20% maior

que o genoma de 800 kb de *M. pneumoniae* é 40% maior que o genoma de 580 kb de *M. genitalium* (FRASER et al., 1995). A porcentagem de G+C é de 26,6%, sendo a taxa mais baixa encontrada entre as bactérias com genoma sequenciado, com exceção de *U. urealyticum* (GLASS et al., 2000). No cromossomo de *M. pulmonis*, foram identificadas 784 regiões codificantes (CDS), cerca de uma a cada 1,23 kb. Destas, 62% correspondem a proteínas de função conhecida, 12% são semelhantes à proteínas de função indeterminada, e 26% não apresentam similaridade com seqüências conhecidas. Estas porcentagens são comparáveis às obtidas nos outros genomas bacterianos (CHAMBAUD et al., 2001).

i. Fatores de Virulência

Um dos principais achados do sequenciamento do genoma de *M. pulmonis* foi a identificação de diversos genes candidatos a fatores de virulência. Entretanto, como nos outros mollicutes cujo genoma foi seqüenciado, não foram encontrados fatores de virulência clássicos, como toxinas e super-antígenos (CHAMBAUD, 2000). Assim, a patogenicidade dos micoplasmas parece ser resultado principalmente da resposta imune e inflamatória do hospedeiro. Por outro lado, além do antígeno vsa, várias outras proteínas podem ser candidatas a fator de virulência. Entre elas, destacam-se uma tiol peroxidase, que pode permitir a proteção dos micoplasmas contra os peróxidos produzidos por si mesmos ou pelo hospedeiro. Duas nucleases secretadas também foram identificadas, possivelmente envolvidas na captação de precursores dos ácidos nucléicos. Foram identificadas também uma glicoprotease, e uma metionina sulfóxido redutase (MsrA), envolvida na proteção contra o estresse oxidativo. Foram identificadas ainda uma exoribonuclease semelhante à proteína VacB de *Shigella flexneri*, e uma proteína capaz de promover a estimulação de neutrófilos (NapA). Duas hemolisinas, A e C, foram também identificadas no genoma de *M. pulmonis* (CHAMBAUD, 2000). A atividade hemolítica de membrana dos micoplasmas já havia sido caracterizada anteriormente, provavelmente devida à um mecanismo de formação de poros na membrana

do eritrócito (MINION & JARVILL-TAYLOR, 1994). Por outro lado, a hemólise pela produção de H_2O_2 também foi caracterizada em *M. pulmonis* (HIMMELREICH et al., 1996; SOMERSON et al., 1965). Entretanto, esta hemolisina A parece ser um bom candidato à fator de virulência, pois sua inativação no patógeno suíno *Serpulina hyodysenteriae* provocou uma queda significativa na patogenicidade deste microrganismo (HYATT et al., 1994). A demonstração da participação destes produtos de genes na virulência ainda não foi realizada em nenhum micoplasma.

No Brasil, os trabalhos de nosso grupo têm se concentrado principalmente na associação de espécies de micoplasmas com diferentes doenças humanas. Pudemos demonstrar a presença de *M. penetrans* em indivíduos infectados pelo HIV em nossa população, avaliando o perfil de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*M. penetrans* nestes pacientes (CORDOVA, et al., 1999), e também sua detecção pela PCR (CORDOVA, et al., 2000). Pudemos demonstrar também a presença de *M. fermentans* neste grupo de pacientes, e discutimos ainda o papel que outros mollicutes mais comumente encontrados no trato urogenital, como *M. hominis*, *U. urealyticum* e *U. parvum* podem ter em indivíduos imunodeprimidos (CORDOVA & CUNHA, 2000). A demonstração, em trabalhos de nosso grupo, da presença de *M. genitalium* em pacientes com uretrite não gonocócica também foi inédita no Brasil (CORDOVA & CUNHA, 2002). Entretanto, a comprovação da associação de mollicutes com certas manifestações tem sido dificultada em parte pela ausência de ferramentas genéticas para serem utilizadas nos modelos experimentais de infecção. Desta forma, o desenvolvimento de sistemas de transformação e transferência de genes para o estudo funcional do genoma destes microrganismos pode esclarecer os mecanismos de patogenicidade dos mollicutes. No futuro, estes estudos podem ter reflexos no tratamento e principalmente no desenvolvimento de vacinas contra estes microrganismos.

O desenvolvimento de um sistema para o estudo funcional dos genes de *M. pulmonis* pode ter impacto principalmente no

desenvolvimento de vacinas. A Micoplasmose Respiratória Murina é responsável por altas taxas de morbidade em ratos e camundongos de laboratório. Uma vacina eficaz contra este microrganismo eliminaria também as interferências nos experimentos que utilizam estes animais infectados, infecção esta que muitas vezes apresenta-se de forma sub-clínica. Além disso, um sistema de transferência de genes em *M. pulmonis* provavelmente trará grandes progressos no estudo da patogenicidade de *M. pneumoniae*, através do modelo de infecção experimental.

O estudo funcional dos genes de *M. mycoides* também poderá trazer enormes benefícios para a medicina veterinária, principalmente no desenvolvimento de vacinas contra a Pleuropneumonia Contagiosa Bovina, que ainda persiste na África e vem ameaçando constantemente a Europa. Da mesma forma, a disponibilidade de um sistema de transferência de genes em *M. capricolum* poderia ter uma grande importância no desenvolvimento de sistemas de expressão de genes heterólogos no desenvolvimento destas vacinas.

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

- Caracterizar experimentalmente as origens de replicação cromossômica (*oriC*) de *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*, *M. genitalium* e *M. pulmonis* através de sua clonagem em plasmídeos artificiais e transformação dos micoplasmas, e avaliação de sua utilização para o estudo funcional de genes específicos destes microrganismos.

Objetivos Específicos:

- Avaliar a utilização da *oriC* de *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*, *M. genitalium* e *M. pulmonis* para o desenvolvimento de plasmídeos artificiais capazes de se replicar nas células destes microrganismos;
- Avaliar a utilização de plasmídeos contendo a *oriC* de *M. capricolum* subsp. *capricolum* para a transformação de *M. mycoïdes* subsp. *mycoïdes* variedade LC;
- Avaliar a utilização de plasmídeos contendo a *oriC* de *S. citri* para a transformação de *M. pulmonis*;
- Verificar o comportamento dos plasmídeos artificiais replicativos em *M. pulmonis* quanto à sua integração no cromossomo do micoplasma;
- Verificar o comportamento dos plasmídeos artificiais replicativos em *M. pulmonis* quanto à sua estabilidade na célula do micoplasma na ausência de pressão seletiva;
- Avaliar a utilidade dos plasmídeos artificiais replicativos em *M. pulmonis* para os estudos funcionais do genoma dos micoplasmas, obtendo clones de *M. pulmonis* com o gene da hemolisina A mutado por inserção dos vetores de dirupção.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Cepas bacterianas, plasmídeos e condições de cultura:

1.1. Cepas de micoplasmas:

Dentre as espécies de micoplasmas de origem animal empregadas neste trabalho, foram utilizadas a cepa tipo Califórnia KID^T de *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*, a cepa tipo YG^T de *M. mycoïdes* subsp. *mycoïdes* variedade LC, e a cepa UAB CTIP de *M. pulmonis*. Esta última cepa, isolada a partir de um camundongo sintomático infectado experimentalmente com a cepa UAB CT, foi a mesma utilizada para o sequenciamento completo do genoma de *M. pulmonis*. Foi também utilizada a cepa tipo G37^T de *M. genitalium*, um micoplasma de origem humana.

1.1.1. Condições de cultivo dos micoplasmas:

M. genitalium foi cultivado a 37°C em meio SP-4 modificado sólido e líquido (**tabela IV, Anexo**), e os micoplasmas de origem animal foram cultivados a 37°C em meio Hayflick N modificado sólido e líquido (**tabela V, Anexo**) (FREUND, 1983). Para *M. pulmonis*, o meio foi suplementado com 1% de BBLTM IsoVitalexTM Enrichment (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA). Os meios sólidos foram preparados a partir dos meios líquidos, acrescidos de 1% de Agar Noble (Difco).

Considerando que a multiplicação dos micoplasmas não causa turbidez do meio líquido de cultura, seu crescimento é verificado pela alteração do pH do meio, revelada pela mudança de cor do indicador vermelho de fenol adicionado à formulação. Todas as espécies de micoplasmas empregadas neste

trabalho apresentam o metabolismo da glicose como principal fonte de energia.

Deste modo, o crescimento dos micoplasmas é revelado pela acidificação do meio de cultura.

Assim que foi verificado o princípio da acidificação do meio, foram realizados subcultivos, tomando-se 0,2 mL da cultura e inoculando em 1,8 mL de meio novo. Este novo cultivo diluído 1:10 corresponde à segunda passagem (P2). Para cada cultura o número de passagens realizadas foi anotado, e as cepas de micoplasmas foram mantidas congeladas à -80°C .

Foram utilizados 0,1 mL das culturas de micoplasmas em meio líquido para inoculação placas de 6 mm de diâmetro contendo meio sólido. O crescimento das colônias de micoplasmas foi verificado por observação microscópica. As colônias foram repicadas em 2 mL de meio líquido adequado para cada espécie, com o auxílio de uma pipeta Pasteur.

1.1.2. Isolamento dos micoplasmas por filtração:

O simples procedimento de repicar uma colônia isolada em meio sólido, como feito para a maioria das bactérias, tem sido demonstrado ineficaz para a separação de populações mistas de mollicutes. Frequentemente, tem-se observado a existência de sorotipos, ou até mesmo de espécies diferentes de mollicutes presentes, como agregados de pequenos filamentos ou formas cocóides nas culturas em meio sólido ou líquido. Desta forma, para assegurar que uma cultura de um mollicute foi originada a partir de uma única célula, três etapas de isolamento por filtração em membranas de $0,22\ \mu\text{m}$ a $0,45\ \mu\text{m}$ são recomendadas (TULLY, 1983). Para a obtenção de um clone de *M. pulmonis* com o gene da hemolisina A mutado por recombinação homóloga, 2 mL das culturas do micoplasma transformado com os vetores de dirupção foram filtrados em membrana de $0,45\ \mu\text{m}$. O filtrado resultante foi diluído a 10^{-1} e 10^{-2} , e 200 μL das diluições foram inoculados em placas com meio sólido contendo 5 $\mu\text{g/mL}$ de tetraciclina. Após a incubação, colônias isoladas que cresceram no agar foram repicadas em meio líquido, e a cultura resultante foi filtrada e inoculada em meio sólido como anteriormente. Este procedimento foi repetido uma vez mais, quando

algumas colônias isoladas que cresceram em meio sólido foram repicadas em 2 mL de meio líquido, e incubadas até o início da acidificação do meio. Em seguida, as culturas de micoplasma clonadas por filtração foram armazenadas à -80°C .

1.2. *Escherichia coli*:

Para os experimentos de construção e propagação de plasmídeos, foi utilizada a cepa TG1 de *E. coli* {*supE hsdΔ5 thiΔ (lac-proAB)F'[traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15]*}. Os microrganismos foram cultivados em aerobiose em meio Lúria-Bertani (LB) líquido (bacto-peptona 10 g/L, extrato de levedura 10 g/L, NaCl 5g/L, pH 7,0) a 37°C sob agitação a 200 rpm, ou em meio LB sólido (contendo 15 g/L de agar). As bactérias transformadas com plasmídeos foram cultivadas da mesma forma em meio LB adicionado de ampicilina a 50 $\mu\text{g/ml}$ e de tetraciclina a 5 $\mu\text{g/ml}$ (SAMBROOK et al., 1989).

1.3. Plasmídeos:

Todos os experimentos de clonagem foram feitos utilizando como vetor o plasmídeo pSRT2, desenvolvido no *Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire - IBVM* do *INRA* de Bordeaux (LARTIGUE et al., dados não publicados). O vetor pSRT2 contém o determinante de resistência à tetraciclina *tetM*, obtido a partir do transposon *Tn916*, inserido no sítio da enzima *PstI* na região de clonagem múltipla do plasmídeo de terceira geração pBS (Stratagene, La Jolla, Ca, USA), sob o controle do promotor do gene da espiralina do mollicute *Spiroplasma citri* (WILLIAMSON et al., 1991), um patógeno de plantas (**figura 7**).

Figura 7. Mapa do vetor pSRT2, desenvolvido a partir do plasmídeo pBS por inserção do determinante de resistência à tetraciclina (*tetM*) no sítio da enzima *PstI*

na região de clonagem múltipla, sob o controle do promotor do gene da espiralina de *S. citri* (PS).

2. Análise das seqüências das regiões *oriC* dos molículos:

Os DnaA *boxes* foram procurados nas regiões *oriC* dos molículos com o auxílio do software MEME/MAST (BAILEY & ELKAN, 1994), disponível no endereço eletrônico: <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/motif/meme>

. As seqüências nucleotídicas das regiões *oriC* de *M. capricolum* subsp. *capricolum* e *S. citri*, do genoma de *M. genitalium* e *M. pulmonis* estão disponíveis no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html>), sob os números de acesso: D90426, Z19108, L43967 e AL445566, respectivamente. A seqüência completa do genoma de *M. genitalium* pode também ser encontrada do endereço <http://www.tigr.org/tdb/CMR/gmg/htmls/SplashPage.html>, e a seqüência completa do genoma de *M. pulmonis* pode ser encontrada no endereço: <http://genolist.pasteur.fr/MypuList/>.

Foi utilizada na pesquisa uma seqüência aleatória baseada na seqüência consenso de DnaA *boxes* de *E. coli*: 5'-(T/C)(T/C)(A/T/C)T(C/A)C(A/G)(C/A/T)(A/C)-3'. As seqüências foram examinadas com uma janela de 150 bp, com incrementos de 100 bp. O tamanho dos motivos pesquisados foi inicialmente restringido a 9 bp, e ampliado a 6-11 bp em uma segunda análise.

3. Métodos de análise e modificação de DNA:

Dois métodos foram utilizados para purificar o DNA: desproteinização com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico seguida de precipitação com etanol, para DNA genômico ou plasmidial, ou adsorção com resinas de sílica, para DNA resultante de tratamento enzimático ou previamente separado por eletroforese em gel de agarose.

3.1. Purificação do DNA:

3.1.1. Desproteinização e precipitação com etanol :

A desproteinização foi feita adicionando-se à amostra um volume

igual de fenol contendo 0,1% de hidroxiquinoleína, saturado com tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH = 8). A mistura foi homogeneizada por 1 minuto, e a fase aquosa foi separada da fase orgânica por centrifugação a 10.000 x g por 5 min. Uma segunda extração foi feita sobre a fase aquosa adicionando-se um volume igual de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). Os traços de fenol foram removidos adicionando-se à fase aquosa um volume igual de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após homogeneização, a fase aquosa foi separada novamente da fase orgânica por centrifugação a 10.000 x g por 5 min. O DNA foi precipitado da fase aquosa adicionando-se dois volumes de etanol absoluto e um décimo do volume de acetato de sódio 3 M (pH = 7,0). O precipitado foi separado por centrifugação a 12.000 x g por 30 min, lavado com etanol a 70% e centrifugado novamente a 12.000 x g por 15 min. Depois de seco, o DNA foi dissolvido no volume apropriado de tampão TE (SAMBROOK et al., 1989).

3.1.2. Adsorção com resinas de sílica:

Grande parte dos kits comerciais de purificação de DNA baseia-se na utilização de resinas de sílica. O DNA a ser purificado é colocado em presença de uma solução que aumenta a força iônica e dissolve a agarose por ação de agentes caotrópicos, como o tiocianato de guanidina ou iodeto de sódio. A resina adicionada, na concentração indicada pelo fornecedor, liga-se ao DNA, e o complexo DNA/sílica é recuperado por centrifugação. Em seguida, o sedimento é lavado com etanol a 70% e deixado secar ao ar. A eluição é realizada diminuindo-se a força iônica por adição de Tris 10 mM, e o DNA é separado da resina por centrifugação. Dois kits foram utilizados neste trabalho, o GeneClean II (BIO 101, La Jolla, CA, USA), e o QIAEX II ® (Qiagen GmbH, Hidel, Germany).

3.2. Extração do DNA genômico de micoplasmas para amplificação por PCR:

Para amplificação pela PCR, o DNA de uma cultura de micoplasmas foi purificado de acordo com o protocolo descrito por BARBEYRAC et al. (1996), com pequenas modificações. Um mL do meio de cultura foi centrifugado a 13.000 x g por 30 min, ressuspensionado em 500 µL de tampão de lise (EDTA 1 mM, Tris-Cl 10 mM, 0,1% Triton X-100, proteinase K 200 µg/mL, pH = 8,0) e incubado a 56°C por 60 min. As amostras foram aquecidas a 100°C por 10 min

para inativação da proteinase K, e a seguir submetidas à desproteinização com fenol/clorofórmio. O DNA foi ressuspendido em 100 µL de tampão TE.

3.3. Extração do DNA genômico dos micoplasmas para Southern blotting:

Para digestão com enzimas de restrição e hibridação, o DNA genômico de micoplasmas foi purificado a partir de 10 mL de cultura. O procedimento é baseado no protocolo de MARMUR (1961), com algumas modificações. A cultura foi centrifugada a 15.000 x *g* por 30 min a 4 °C, o sedimento ressuspendido em 1 mL de tampão Tris 10 mM, EDTA 50 mM (pH = 7,0) gelado, e armazenado a -20 °C. As células foram descongeladas e o volume dividido em dois tubos de microcentrífuga tipo Eppendorff. Foram adicionados 10 µL de proteinase K a 10 mg/mL e 50 µL de SDS 10%, sendo as amostras incubadas a 56 °C por uma hora. Em seguida, foi feita a desproteinização com duas extrações com fenol e uma extração com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). O DNA foi precipitado com acetato de sódio e etanol e ressuspendido em 375 µL de tampão TE contendo 2 µL de RNase a 10 mg/mL, e as amostras foram incubadas a 37 °C por 30 min. Em seguida foram adicionados 72,5 µL de tampão TE, 50 µL de EDTA 0,5 M (pH = 8,0), e 2,5 µL de proteinase K a 10 mg/mL, com nova incubação por 30 min a 37 °C. Foi feita nova desproteinização com 3 extrações com fenol, uma extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e uma extração com clorofórmio/álcool isoamílico. O DNA foi precipitado com acetato de sódio e etanol, lavado com etanol a 70%, e ressuspendido em 100 µL em tampão TE.

3.4. Extração do DNA plasmidial:

Para análise das novas construções plasmidiais, colônias de *E. coli* contendo os plasmídeos recombinantes que cresceram em até 18 horas em meio LB sólido contendo os antibióticos utilizados para seleção após a transformação, foram inoculadas em 1,5 mL de meio LB líquido com antibiótico, e incubadas a 37 °C sob agitação por cerca de 18 horas. O DNA plasmidial foi extraído a partir destas culturas com reagentes preparados no próprio laboratório, de acordo com o método da lise alcalina descrito por BIRNBOIM & DOLY (1979), utilizando o seguinte procedimento: as culturas foram centrifugadas por 1 min a 3.500 x *g*, e as

células foram ressuspensas em 100 µL de tampão TGE (Tris 25 mM, Glicose 50 mM, EDTA 10 mM). Foram adicionados aos tubos 200 µL de NaOH contendo 1% de SDS, e as amostras foram incubadas por 5 min em banho de gelo. Em seguida, foram adicionados 150 µL de solução de acetato de potássio (acetato de potássio 29,4 g%, ácido acético glacial 11,5%, concentração final: potássio 3 M, acetato 5 M), as amostras foram agitadas durante 5 min por inversão, e incubadas por 5 min em banho de gelo. Os tubos foram centrifugados a 14.000 x *g* por 10 min a 4 °C. À 380 µL dos sobrenadantes foram adicionados 300 µL de isopropanol, e os tubos foram homogeneizados e centrifugados a 14.000 x *g* por 5 min a 4 °C. O DNA obtido foi lavado com 500 µL de etanol 70% por centrifugação a 14.000 x *g* por 1 min a 4 °C, deixado secar ao ar e ressuspendido em 100 µL de tampão TE contendo 10 µg/mL de RNase A. Alternativamente, para experimentos de clonagem e subclonagem, que requerem um DNA com maior grau de pureza, o DNA plasmidial foi extraído a partir destas culturas de *E. coli* com o auxílio do kit QIAprep® spin Miniprep (Qiagen GmbH, Hidel, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. Para a obtenção de grandes quantidades de DNA plasmidial purificado para armazenamento, foi utilizado o kit EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen GmbH), de acordo com as instruções do fabricante.

3.5. Quantificação de DNA:

O DNA purificado pelos métodos descritos acima foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm, onde uma unidade de absorbância corresponde a 50 µg de DNA/mL. Para confirmação, a quantidade de DNA na amostra foi estimada por comparação da intensidade de sua fluorescência sob luz U.V. após eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo, em comparação com um padrão comercial (Smartladder®, Eurogentec, Seraing, Belgium).

3.6. Digestão do DNA com endonucleases de restrição:

O DNA foi digerido em presença de uma unidade da enzima de restrição apropriada por µg de DNA plasmidial, ou 10 unidades por µg de DNA genômico, sendo que o volume de enzima não excedeu 1/10 do volume total da reação. A solução continha ainda o tampão de reação da enzima e 0,1 µg/mL de soroalbumina bovina (BSA) no caso de digestão de DNA genômico. O tempo de

incubação foi de três horas para DNA plasmidial, e cerca de 12 horas para DNA genômico, na temperatura indicada pelo fornecedor da enzima (SAMBROOK et al., 1989).

3.7. Análise dos fragmentos de restrição:

Os fragmentos de DNA obtidos após digestão com as enzimas de restrição foram separados por eletroforese em gel de agarose (SAMBROOK et al., 1989). A concentração de agarose utilizada foi de 0,8 a 1,0%, fundida em tampão TAE (Tris 40 mM, EDTA 1 mM, acetato de sódio 5 mM, pH = 8,0), utilizado também como tampão de migração. Para separação do DNA no gel, um volume de tampão de aplicação (glicerol 50%, SDS 1%, EDTA 0,1 M, azul de bromofenol 0,5 mg/mL) foi misturado com 10 volumes de amostra. A eletroforese foi realizada com aplicação de 100 V por cerca de duas horas. Após a migração, os fragmentos de DNA foram visualizados pela coloração com o brometo de etídeo adicionado ao gel numa concentração de 10 µg/mL, o qual se intercala entre as bases nucleotídicas, emitindo fluorescência quando excitado por luz U.V. no comprimento de onda de 254 nm. A distância de migração do DNA é inversamente proporcional ao logaritmo do número de pares de base que o compõem. Deste modo, o tamanho de um fragmento é estimado por comparação com padrões de tamanho conhecido, como o Smartladder® (Eurogentec), o 1 kb DNA plus ou o 100 bp DNA ladder (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA).

3.8. Clonagem dos fragmentos de DNA:

3.8.1. Preparação dos vetores:

Para clonar os fragmentos de DNA, os vetores foram digeridos com a enzima de restrição apropriada, e em seguida os fosfatos das extremidades 5' foram eliminados com 20 U da enzima fosfatase alcalina extraída de intestino bovino (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany), em presença de seu tampão de reação diluindo-se 10 vezes o volume inicial com H₂O. Após 3 horas de incubação a 37°C, a fosfatase alcalina foi inativada adicionando-se EDTA a uma concentração final de 50 mM, e os vetores foram purificados por desproteinização com fenol/clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989).

3.8.2.Preparação dos fragmentos a serem clonados:

Os fragmentos de DNA a serem clonados foram digeridos com a enzima de restrição apropriada, e separados por eletroforese em gel de agarose. O fragmento de tamanho desejado foi cortado do gel, e purificado com o auxílio de resinas de sílica utilizando os kits GeneClen II (BIO 101) ou QIAEX II ® (Qiagen GmbH).

3.8.3.Inserção do DNA no vetor:

Os fragmentos purificados foram inseridos por ligação fosfodiéster entre as extremidades hidroxila-3' do vetor linearizado e as extremidades fosfato-5' dos fragmentos a serem clonados, com o auxílio da enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). Cerca de 50 ng do vetor foram misturados com cerca de 200 ng do fragmento a ser clonado, em presença 1 U de enzima e do tampão de reação fornecido pelo fabricante, em um volume de 20 µL. Após cerca de 18 horas de incubação a 16 °C, os produtos da reação de ligação foram analisados através de transformação e replicação em *E. coli*.

3.8.4.Transformação de *E. coli*:

A transformação de *E. coli* TG1 foi feita pelo método químico descrito por Hanahan (HANAHAN, 1983).

3.8.4.1.Preparação das células competentes:

Uma colônia de *E. coli* mantida em meio mínimo M9 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 12,8 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, NaCl 0,5 g/L, NH_4Cl 1 g/L, MgSO_4 2 mM, CaCl_2 0,1 mM, glicose 0,4%, agar 15 g/L) (SAMBROOK et al., 1989) foi inoculada em 5 mL de meio LB, e incubada por cerca de 18 horas a 37 °C sob agitação a 200 rpm. Desta cultura, 0,3 mL foram inoculados em 30 mL de meio SOB (bacto-triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 0,5 g/L, KCl 0,2 g/L, pH=7,3), contendo 0,6 mL de MgCl_2 1M, e a suspensão foi incubada a 37 °C sob agitação a 200 rpm até atingir uma D.O. em torno de 0,5 a 600 nm. As células foram em seguida incubadas em banho de gelo por 10 min, e centrifugadas a 6.500 x g por 15 min a 4 °C. As células foram ressuspensas em 10 mL de tampão TFB [MES(K) 10 mM, RbCl 100 mM, MnCl_2 45 mM, CaCl_2 10 mM, cobalto-hexamina C13 3 mM], e incubadas por 15 min

em banho de gelo. Os tubos foram centrifugados a $6.500 \times g$ por 10 min a 4°C , e as células foram ressuspensas em 1,2 mL de tampão TFB a 4°C . Foram adicionados aos tubos 40 μL de DMSO seguido de incubação por 5 min em banho de gelo, 40 μL de DTT 2,25 M seguido de incubação por 10 min em banho de gelo, e novamente 40 μL de DMSO.

3.8.4.2. Transformação:

Cerca de 2 μg de DNA plasmidial, ou 5 μL do produto da reação de ligação para inserção de um fragmento em um vetor, diluídos em no máximo 30 μL de H_2O , foram adicionados a 200 μL de células de *E. coli* competentes preparadas como descrito no item 3.8.4.1, e incubadas por 45 min em banho de gelo. Em seguida, os tubos foram submetidos a um choque térmico por 2 min a 42°C . As células foram incubadas novamente em banho de gelo por 2 min, e foram adicionados aos tubos 800 μL de meio SOC (bacto-triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 0,5 g/L, MgCl_2 10 mM, glicose 20 mM) seguido de incubação a 37°C por uma hora.

3.8.4.3. Seleção dos clones transformados:

As células de *E. coli* transformadas com o plasmídeo desejado foram selecionadas inoculando 200 μL da suspensão obtida como descrito no item 3.8.4.2, em placas de Petri contendo meio LB sólido com 50 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina e 5 $\mu\text{g/mL}$ de tetraciclina. As placas foram incubadas a 37°C por no máximo 18 horas para o desenvolvimento de colônias expressando os genes de resistência presentes nos plasmídeos. A presença do plasmídeo desejado foi verificada após extração do DNA plasmidial seguida de verificação do padrão de restrição por digestão com diferentes enzimas.

3.9. Transformação dos micoplasmas:

3.9.1. Transformação por polietileno glicol (PEG):

M. capricolum, *M. mycoides* e *M. pulmonis* foram transformados com o auxílio de PEG de acordo com o método descrito por DYBVIG et al. (1996). Três mL de uma cultura de micoplasma no final de fase log de crescimento foram centrifugados por 10 minutos a $8.000 \times g$ e lavados com 1 mL de solução ST

(Sacarose 0,5 M, Tris 0,01 M, pH = 6,5) para *M. capricolum* e *M. mycoïdes*, ou com 1 mL de PBS (pH = 7,2) para *M. pulmonis*. O sedimento foi ressuspendido em 250 µL de CaCl₂ 0,1 M (para *M. capricolum* e *M. mycoïdes*), ou em 250 µL de PBS (para *M. pulmonis*) e incubado no gelo por 30 min. O DNA do plasmídeo a ser testado foi adicionado ao tubo juntamente com 10 µg de RNAt de levedura. Logo em seguida, foram adicionados 2 mL de PEG 8.000 (70% em Tris 0,01 M, pH = 6,5 para *M. capricolum* e *M. mycoïdes*; ou 40% em PBS para *M. pulmonis*), e a suspensão foi deixada por 2 minutos a temperatura ambiente. Foram adicionados 10 mL de solução ST ou PBS, e a solução foi homogeneizada e centrifugada por 15 min a 12.000 x g. As células foram ressuspendidas em 250 µL de meio de cultura sem antibiótico, e incubadas por 2 horas (para *M. pulmonis* e *M. mycoïdes*) ou 30 min (para *M. capricolum*) a 37 °C. Em seguida, 200 µL da suspensão pura e diluída a 10⁻¹ e 10⁻² foram inoculados em meio sólido contendo 2 µg/mL de tetraciclina. As placas foram incubadas a 37°C em aerobiose por até quatro semanas.

Para o cálculo da eficiência da transformação, 200 µL destas diluições seriadas de micoplasmas (de 10⁻³ a 10⁻⁵) foram inoculadas também em meio sólido sem pressão seletiva, para a determinação do número de CFUs (Unidades Formadoras de Colônias) viáveis presentes em cada amostra. A eficiência foi expressa em número de transformantes/CFU/µg de DNA plasmidial adicionado. A partir de três dias de incubação as placas foram observadas para verificar o aparecimento de colônias resistentes à tetraciclina (tet^R). Cerca de 10 colônias tet^R de cada experimento foram repicadas em 2 mL de meio de cultura líquido, no qual a concentração de tetraciclina foi aumentada gradativamente de 2 até 50 µg/mL ao longo das passagens. Como controle negativo de transformação, uma cultura de micoplasmas foi tratada como descrito acima, entretanto o DNA plasmidial foi substituído por 10 µL de H₂O MilliQ® autoclavada. Este procedimento teve como objetivo verificar o eventual aparecimento de colônias de micoplasmas resistentes à tetraciclina por mutação espontânea, evitando erros na interpretação dos resultados. Como controle positivo de transformação, foi utilizado o plasmídeo pAM120, que contém o transposon Tn916, e que se mostrou capaz de transformar *M. pulmonis* (DYBVG & ALDERETE, 1988), *M. capricolum* (KING & DYBVG, 1994), e *M. mycoïdes* (KING & DYBVG, 1991).

3.9.2. Transformação por eletroporação:

M. pulmonis e *M. genitalium* foram transformados por eletroporação de acordo com o método descrito por RENAUDIN & BOVE (1996). Três mL de uma cultura no final da fase log de crescimento foram centrifugados em dois tubos de 1,5 mL a 14.000 x *g* por 15 min a 18°C, e os sedimentos ressuspensos em 1 mL de tampão HS (HEPES 8 mM, sacarose 280 mM, pH = 7,4). As suspensões foram centrifugadas a 14.000 x *g* por 15 min a 18°C, e os sedimentos ressuspensos em 200 µL de tampão HS. O volume dos dois tubos foi agrupado em um único tubo para transformação com 10 à 30 µg do plasmídeo desejado (num volume máximo de 40 µL) com adição de 10 µg de tRNA de levedura. Após a adição do DNA plasmidial, as células do micoplasma foram incubadas por 10 min a 0°C, e em seguida submetidas a eletroporação com um pulso a 2,5 kV, 3 µF, e 1.000 Ω em cubetas de 0,4 mm. Imediatamente foram adicionados 800 µL de meio de cultura sem antibiótico, e as células foram incubadas a 37°C por 2 horas (para *M. pulmonis*) ou por 16 horas (para *M. genitalium*) para expressão do marcador de seleção *tetM*. Em seguida, 200 µL das células de micoplasma submetidas à transformação e 200 µL de diluições seriadas destas células (de 10⁻¹ a 10⁻²) foram inoculados em meio sólido contendo 2 µg/mL de tetraciclina, e as placas foram incubadas a 37°C por até 8 semanas. A partir de três dias de incubação as placas foram observadas para verificar o aparecimento de colônias tet^R. O plasmídeo pAM120 foi utilizado como controle positivo de transformação, e H₂O MilliQ® autoclavada foi utilizada como controle negativo de transformação. O cálculo da eficiência foi feito como na transformação por PEG.

3.10. Amplificação do DNA pela PCR:

A amplificação do DNA foi realizada pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando-se uma DNA polimerase termoestável, como descrito por SAIKI et al. (1988). A reação é baseada na repetição de um ciclo que compreende três etapas: a desnaturação do DNA produzindo assim duas fitas simples que servem de matriz, a hibridação de um oligonucleotídeo (*primer*) específico em cada fita, e a síntese de uma nova fita de DNA a partir destes

primers pela enzima DNA polimerase. A repetição deste ciclo resulta na amplificação exponencial de um fragmento cujo tamanho é delimitado pelo par de *primers*. Para obter fragmentos onde não era desejável a eventual ocorrência da incorporação errônea de alguns nucleotídeos durante a amplificação pela Taq DNA polimerase (Life Technologies), esta enzima foi substituída pela Pfu DNA polimerase (Stratagene). Os *primers* foram desenhados para reconhecer seqüências no DNA alvo com alta especificidade, e com uma porcentagem de G+C em torno de 50%. Na extremidade 5' de alguns *primers* foram adicionadas seqüências reconhecidas por enzimas de restrição, como *Bam*HI (GGATCC), *Sph*I (GCATGC), e *Eco*RI (GAATTC), para facilitar a clonagem dos fragmentos amplificados. A lista dos *primers* utilizados neste trabalho, bem como as temperaturas de hibridização utilizadas nas reações e os respectivos fragmentos amplificados estão descritos na **tabela I**.

Tabela I. Relação dos pares de *primers* utilizados neste trabalho, indicando sua seqüência, gene alvo, e temperatura de hibridização utilizada nas reações de amplificação. As seqüências sublinhadas indicam os sítios de restrição adicionados para facilitar a clonagem dos fragmentos amplificados.

Primer	Seqüência	Temperatura de hibridização	alvo	Tamanho do fragmento
TetL	5'-TTATCAACGGTTTATCAGG-3'	55 °C	gene <i>tetM</i>	397 bp
TetR	5'-CGTATATGCAAGACG-3'			(BLANCHARD et al., 1992)
MCAPO1	5'-GACGGGATCCTTTAGTAGCCATTCTTGCTC-3'	54 °C	região <i>oriC</i> de	1,97 kb
MCAPO2	5'-AGGCGGATCCCAATTACTTTGGCAGC-3'		<i>M. capricolum</i>	
MGOR1	5'-CGGTGGATCCGGCATTAAATTGTTCC-3'	56 °C	Região intergênica	784 bp
MGOR2	5'-TCGCGGATCCGCCTAACTTGAAAATAAGCTCC-3'		<i>spoOJ -dnaA</i> de <i>M. genitalium</i>	

MGOR3	5'-GTCCGGATCCCATAGTTGCCATTGTAG-3'	56 °C	Região intergênica <i>dnaN-spoOJ</i> de <i>M. genitalium</i>	959 bp
MGOR4	5'-GCTGCGGATCCGTATTTCATTGTTAGC-3'			
OR1	5'-ATTAGGGATCCGCACTCTGGTCAGCGCTAGATC-3'	56 °C	região <i>oriC</i> de <i>M. pulmonis</i>	1,9 kb
OR2	5'-TCGCGGATCCGCCTAACTTGAAAATAAGCTCC-3'			
OR2	5'-TCGCGGATCCGCCTAACTTGAAAATAAGCTCC-3'	56 °C	Região intergênica <i>dnaA-dnaN</i> de <i>M. pulmonis</i>	327 bp
OR3	5'-GGCTGGATCCGAAAACCTTATCCAAGG-3'			
OR1	5'-ATTAGGGATCCGCACTCTGGTCAGCGCTAGATC-3'	56 °C	Região intergênica <i>recD-dnaA</i> de <i>M. pulmonis</i>	262 bp
OR4	5'-CGCTAGGATCCCTATTTTGTCAAGGC-3'			
OR1	5'-ATTAGGGATCCGCACTCTGGTCAGCGCTAGATC-3'	56 °C	Região intergênica <i>recD-dnaA</i> de <i>M. pulmonis</i>	262 bp
OR5	5'-CGCTAGAATTCTCTATTTTGTCAAGGC-3'			
OR2	5'-TCGCGGATCCGCCTAACTTGAAAATAAGCTCC-3'	56 °C	Região intergênica <i>dnaA-dnaN</i> de <i>M. pulmonis</i>	327 bp
OR6	5'-GGCTGAATTGAAAACCTTATCCAAGG-3'			
OR7	5'-AATAGGCATGCGCACTCTGGTCAGGCGTAGATC-3'	56 °C	Região intergênica <i>recD-dnaA</i> de <i>M. pulmonis</i>	262 bp
OR8	5'-CGCTAGCATGCCTATTTTGTCAAGGC-3'			
HE1	5'-CCGCGAATTCGAAAAAGAAGCTGTTGG-3'	56 °C	gene <i>hlyA</i> de <i>M. pulmonis</i>	688 bp
HE2	5'-GGCCCGAATTCGAGAGATGTATTCAATG-3'			
HEL	5'-CCCCGAATTCGATAATTGCCTTGACAG-3'	56 °C	gene <i>hlyA</i> de <i>M.</i> <i>pulmonis</i> com +0,2 kb de suas extremidades 5' e 3'	1,05 kb
HER	5'-CAGGTGAATTCGAATTAGCGGCTGAGTC-3'			
OR2	5'-TCGCGGATCCGCCTAACTTGAAAATAAGCTCC-3'	54 °C	Inserção do vetor pMPO1- Δ <i>hlyA</i> no gene <i>hlyA</i> de <i>M.</i> <i>pulmonis</i>	1,2 kb
HEL	5'-CCCCGAATTCGATAATTGCCTTGACAG-3'			
OR2	5'-TCGCGGATCCGCCTAACTTGAAAATAAGCTCC-3'	54 °C	Inserção do vetor pMPO5- Δ <i>hlyA</i> no gene <i>hlyA</i> de <i>M.</i> <i>pulmonis</i>	1,05 kb
HER	5'-CAGGTGAATTCGAATTAGCGGCTGAGTC-3'			

A especificidade da hibridização dos *primers* desenvolvidos foi analisada com o auxílio do programa BLAST, disponível no endereço eletrônico: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. As reações de amplificação foram feitas em volumes de 50 μ L, contendo tampão de reação da enzima (Tris-HCl 20 mM, KCl 50 mM, pH = 8,4), MgCl₂ (para Taq DNA polimerase) ou MgSO₄ (para Pfu DNA polimerase) na concentração de 1,5 a 2,0 mM, 200 μ M de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0,2 μ M de cada *primer*, e cerca de 2 ng de DNA plasmidial ou 100 ng de DNA genômico. As amplificações foram precedidas por uma desnaturação inicial por 2 min a 95 °C, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 95 °C por 30 seg., hibridação dos *primers* a 56 °C (ou na temperatura descrita na **tabela I**) por 45 seg., e extensão a 72 °C por 1 min para cada kb amplificado (para

Taq DNA polimerase) ou a 68 °C por 2,5 min para cada 1 kb amplificado (para Pfu DNA polimerase). Ao final dos ciclos foi feita uma extensão a 72 °C ou a 68 °C por 10 min. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%.

3.11. Southern blotting:

3.11.1. Eletroforese e transferência para membrana:

O DNA dos micoplasmas foi analisado por digestão com enzima de restrição e hibridação utilizando o método descrito por SOUTHERN (1975). O DNA genômico purificado foi digerido com a enzima de restrição adequada conforme descrito anteriormente, separado por eletroforese em gel de agarose a 0,8% por cerca de 4 horas, e tratado por 7 min em solução de HCl 0,125 M para depurinação. Após rápida lavagem com água destilada autoclavada, o gel foi incubado por 20 min em solução de desnaturação (NaCl 87,66 g/L, NaOH 20 g/L), e o DNA foi transferido por capilaridade para uma membrana de Nylon (Hybond N+, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) usando a mesma solução alcalina como tampão, por cerca de 16 horas.

3.11.2. Preparação das sondas:

As sondas não radioativas *oriC* e *hlyA* para hibridação com fragmentos da origem de replicação cromossômica dos micoplasmas e do gene *hlyA* de *M. pulmonis*, respectivamente, foram preparadas por PCR adicionando-se 1 µL de dUTP marcado com digoxigenina (DIG-dUTP, Roche Molecular Biochemicals) à reação de amplificação do fragmento com *primers* específicos utilizando a enzima Taq DNA polimerase. Neste caso a frequência de incorporação errônea de nucleotídeos à seqüência amplificada por esta enzima não é significativa para prejudicar a hibridização da sonda. A sonda *hlyA* foi amplificada utilizando os *primers* HE1 e HE2, a sonda *oriC* de *M. pulmonis* foi amplificada utilizando os *primers* OR1 e OR2, e a sonda *oriC* de *M. capricolum* subsp. *capricolum* foi amplificada utilizando os *primers* MCAPO1 e MCAPO2. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, onde o DNA marcado com DIG-dUTP apresenta uma velocidade de migração retardada em relação ao DNA não marcado.

3.11.3. Hibridação:

A membrana previamente obtida foi incubada por 2 horas a 42 °C em 10 mL/100 cm² de solução de pré-hibridação (Formamida 50%, SSC 5x, N-lauroylsarcosina 0,1%, SDS 0,02%, Blocking Reagent [™] 2% [Roche Molecular Biochemicals], DNA de esperma de salmão sonificado e desnaturado 250 µg/mL [Life Technologies]), e a hibridação foi realizada por cerca de 16 horas a 42 °C com 160 ng de sonda (20 ng/mL) em 8 mL/100 cm² de solução de hibridação (Formamida 50%, SSC 5x, N-lauroylsarcosina 0,1%, SDS 0,02%, Blocking Reagent 2%, DNA de esperma de salmão sonificado e desnaturado 100µg/mL). Em seguida, a membrana foi lavada 4 vezes por 15 min a temperatura ambiente com SSC 2x (diluído de um estoque SSC 20x concentrado: NaCl 3 M, citrato de sódio 0,3 M, pH = 7,0) contendo 0,5% de SDS, e 2 vezes por 30 min a 60°C com SSC 0,5x contendo 0,5% de SDS.

3.11.4. Revelação da hibridação:

A revelação da hibridação foi feita por uma reação quimioluminescente com anticorpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatase alcalina e adição de substrato 4-cloro-3-(4-metoxispiro{1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro)tríciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano}-4-il) fenil fosfato dissódico. A membrana foi incubada a temperatura ambiente por 2 min em solução T1 (Tris 100 mM, NaCl 150 mM, pH = 7,5), e por 30 min em 10 mL de solução T2 (solução T1 + 1% Blocking Reagent). Em seguida, a membrana foi incubada em 10 mL de solução T2 contendo anticorpo anti-digoxigenina (fração Fab, diluído 1/10.000, Roche Molecular Biochemicals) por 30 min à temperatura ambiente. Foram feitas duas lavagens de 15 min com solução T1, e a membrana foi equilibrada em solução T3 (Tris 100 mM, NaCl 100 mM) por 5 minutos. O substrato foi diluído 1/100 em 10 mL de solução T3, e incubado com a membrana por 5 min a 37 °C. O sinal quimioluminescente foi detectado por exposição da membrana a um filme de raio-X (BioMax MS-1 Film, Eastmen Kodak, Rochester, NY, USA) por cerca de 1 min.

4. Construção dos plasmídeos artificiais para transformação de micoplasmas:

4.1. *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*:

Para obter plasmídeos artificiais que possam transformar e se replicar de maneira eficiente em *M. capricolum* subsp. *capricolum*, foi clonada no vetor pSTR2 a região *oriC* deste micoplasma, que já havia sido teoricamente determinada com o sequenciamento da região em torno do gene *dnaA* (MIYATA et al., 1993). Um par de *primers* foi desenhado para amplificar um fragmento de 1,97 kb contendo os possíveis DnaA *boxes* localizados ao redor do gene *dnaA* de *M. capricolum*: MCAPO1 e MCAPO2, com a introdução de uma sequência reconhecida pela enzima de restrição *Bam*HI na extremidade 5' dos *primers* para facilitar a clonagem. Cerca de 100 ng de DNA de um estoque de cultura de micoplasma foram amplificados utilizando a enzima Pfu DNA polimerase, e o produto de PCR foi digerido com *Bam*HI, purificado, e inserido no vetor. Após a transformação de *E. coli* com o produto da reação de ligação, as bactérias contendo o plasmídeo recombinante desejado foram analisadas por extração do DNA plasmidial e análise do padrão de restrição do novo plasmídeo construído após digestão com diferentes enzimas de restrição. A orientação do fragmento clonado nas novas construções foi verificada por PCR amplificando 2 ng do DNA plasmidial. O plasmídeo denominado pMCO2, contendo o fragmento clonado orientado no mesmo sentido do gene *tetM*, apresentou PCR positiva com os *primers* MCAPO2 e *tetL*, e o plasmídeo denominado pMCO3, contendo o fragmento clonado orientado no sentido inverso ao do *tetM*, apresentou PCR positiva com os *primers* *tetL* e MCAPO1, resultando num fragmento amplificado de cerca de 3,5 kb, conforme o esquema representado na **figura 8**.

Figura 8. Representação esquemática da determinação da orientação do fragmento clonado para a construção dos plasmídeos pMCO2 e pMCO3, com as duas combinações de *primers* utilizadas: *tetL* + MCAPO1 e *tetL* + MCAPO2.

4.2. Mycoplasma genitalium:

Para tentar construir plasmídeos artificiais que possam transformar e se replicar de maneira eficiente em *M. genitalium*, um par de *primers* foi desenhado para amplificar um fragmento de 784 bp contendo os possíveis DnaA *boxes* localizado na região intergênica *spoJ-dnaA* de *M. genitalium*: MGOR1 e MGOR2, com a introdução de uma sequência reconhecida pela enzima de restrição *Bam*HI na extremidade 5' dos *primers* para facilitar a clonagem na construção do plasmídeo pMGO1. Da mesma forma, outro par de *primers* foi desenhado para amplificar um fragmento de 959 bp localizado na região intergênica *dnaN-spoJ* de *M. genitalium*: MGOR3 e MGOR4, também com a introdução de uma sequência reconhecida pela enzima de restrição *Bam*HI em sua extremidade 5' para a construção do plasmídeo pMGO2. Estes fragmentos amplificados com a enzima Pfu DNA polimerase foram clonados no vetor pSTR2 como descrito anteriormente, e as colônias de *E. coli* transformadas contendo os plasmídeos recombinantes desejados foram analisadas por extração do DNA plasmidial e verificação do padrão de restrição dos novos plasmídeos construído após digestão com diferentes enzimas de restrição.

4.3. Mycoplasma pulmonis:

4.3.1. Clonagem da região *oriC*:

Para obter plasmídeos artificiais que possam transformar e se replicar de maneira eficiente em *M. pulmonis*, foi clonada no vetor pSTR2 a região *oriC* deste molículo, que havia sido determinada teoricamente com o sequenciamento completo de seu genoma (CHAMBAUD et al., 2001). Um par de *primers* foi desenhado para amplificar um fragmento de 1,9 kb contendo os DnaA *boxes* localizados ao redor do gene *dnaA* de *M. pulmonis*: OR1 e OR2, com a introdução de uma sequência reconhecida pela enzima de restrição *Bam*HI na extremidade 5' dos *primers* para facilitar a clonagem. O DNA do micoplasma foi amplificado utilizando a enzima Pfu DNA polimerase, e o produto de PCR foi digerido com *Bam*HI, purificado, e inserido no vetor pSRT2. Após a transformação de *E. coli* com o produto da reação de ligação, as bactérias contendo o plasmídeo

recombinante foram analisadas por extração do DNA plasmidial e verificação do padrão de restrição do novo plasmídeo construído por digestão com diferentes enzimas de restrição. A orientação do fragmento clonado na nova construção foi feita pela PCR. O novo plasmídeo, denominado pMPO1, contendo o fragmento clonado orientado no mesmo sentido do gene *tetM*, apresenta uma PCR positiva com os *primers* tetL e OR2.

4.3.2.Redução da região *oriC* responsável pela replicação autônoma dos plasmídeos artificiais:

A redução do fragmento da região *oriC* de *M. pulmonis* responsável pela replicação autônoma dos plasmídeos artificiais na célula do micoplasma teve como objetivo reduzir a probabilidade de uma eventual integração do vetor no genoma do micoplasma por recombinação homóloga com a região *oriC*. Deste modo, esperamos favorecer a integração de um vetor de interrupção baseado nestes plasmídeos replicativos, no gene a ser inativado. Para amplificar, utilizando a enzima Pfu DNA polimerase, um fragmento de 327 bp contendo os DnaA boxes localizados na região intergênica *dnaA-dnaN* de *M. pulmonis*, foram utilizados os *primers* OR3 e OR2 na construção do plasmídeo pMPO2. Para amplificar um fragmento de 262 bp contendo os DnaA boxes localizados na região intergênica *recD-dnaA*, foram utilizados os *primers* OR1 e OR4, que também contêm o sítio reconhecido pela enzima *Bam*HI em sua extremidade 5' para facilitar a clonagem, na construção do plasmídeo pMPO3. Para clonar os dois fragmentos lado a lado no vetor pSRT2 na construção do plasmídeo pMPO4, o fragmento *recD-dnaA* foi amplificado com os *primers* OR1 e OR5, e o fragmento *dnaA-dnaN* foi amplificado com os *primers* OR2 e OR6. Os *primers* OR5 e OR6 apresentam o sítio de restrição para a enzima *Eco*RI na sua extremidade 5'. Para clonar os dois fragmentos espaçados pelo *tetM* no vetor pSRT2 na construção do plasmídeo pMPO5, o fragmento *recD-dnaA* foi amplificado com os *primers* OR7 e OR8, que apresentam o sítio de restrição para a enzima *Sph*I na sua extremidade 5' para clonagem, e o fragmento *dnaA-dnaN* foi amplificado com os *primers* OR3 e OR2.

5. Construção dos vetores de dirupção para inativação do gene da hemolisina A de *M. pulmonis*:

Para verificar se estes plasmídeos artificiais podem ser úteis para o estudo funcional de genes de micoplasmas, foram construídos vetores para a dirupção do gene da hemolisina A de *M. pulmonis*, que é homólogo ao gene *hlyA* de *Serpulina hyodysenteriae*, um patógeno porcino, cuja inativação resultou numa queda significativa de sua patogenicidade (HYATT et al., 1994).

Para a dirupção, foi escolhida a estratégia de recombinação homóloga com um único *crossing-over*, clonando no vetor de dirupção um fragmento interno do gene da hemolisina A, com uma deleção de 39 nucleotídeos de sua extremidade 5', e de 17 nucleotídeos de sua extremidade 3'. Por outro lado, procurou-se amplificar um fragmento interno de maior tamanho possível, na tentativa de favorecer a recombinação, uma vez que este gene apresenta somente 717 bp. Foram desenhados os *primers* HE1 e HE2, onde foi introduzida a sequência reconhecida pela enzima *EcoRI* em suas extremidades 5' para facilitar a clonagem. O fragmento amplificado com a enzima Taq DNA polimerase foi clonado nos plasmídeos pSRT2, pMPO1 e pMPO5, resultando nos vetores de dirupção pSRT2- Δ *hlyA*, pMPO1- Δ *hlyA* e pMPO5- Δ *hlyA*, respectivamente. A verificação da orientação dos fragmentos clonados foi feita pela PCR. Para o vetor pSRT2- Δ *hlyA*, foram usados os *primers* tetL e HE2, que produzem um fragmento amplificado de cerca de 2,2 kb com o inserto clonado na mesma orientação do *tetM*, e os *primers* tetL e HE1, que produzem um fragmento semelhante com a orientação do inserto clonado no sentido inverso ao *tetM*. O vetor pMPO1- Δ *hlyA* apresenta uma PCR positiva com os *primers* OR3 e HE2 com o fragmento do gene clonado na mesma orientação do *tetM*, com um produto amplificado de cerca de 1,0 kb, ou com os *primers* OR3 e HE1, com um produto semelhante com a orientação do fragmento clonado no sentido inverso ao *tetM*. Para o vetor pMPO5- Δ *hlyA* foram usados os *primers* OR2 e HE2, que produzem um fragmento de cerca de 1,0 kb com o inserto clonado na mesma orientação do *tetM*, e os *primers* OR2 e HE1, que produzem um fragmento semelhante com a orientação do inserto clonado no sentido inverso ao *tetM*.

6. Avaliação da atividade hemolítica de *M. pulmonis*:

A avaliação da atividade hemolítica das culturas de *M. pulmonis* transformadas com os vetores de dirupção pSRT2- $\Delta hlyA$, pMPO1- $\Delta hlyA$ e pMPO5- $\Delta hlyA$ que apresentaram crescimento em meio contendo tetraciclina, foi feita pelo teste de hemólise em tubos de acordo com o procedimento descrito por JARVILL-TAYLOR et al. (1995).

6.1. Preparação das hemácias:

Hemácias humanas foram preparadas a partir de 9 mL de sangue misturados a 1 mL de citrato de sódio (32 g/L) usado como anticoagulante. As hemácias foram lavadas três vezes com PBS-Glicose 0,5% e centrifugadas a 1.000 x g por 5 min. Em seguida, 0,8 mL destas células foram ressuspensos em 9,2 mL de tampão salina-fosfato (PBS) contendo tripsina numa concentração final de 1 mg/mL, seguido de incubação a 37 °C por 30 min. As células foram lavadas mais três vezes com PBS-Glicose 0,5% e ressuspensas a 2% na mesma solução. As hemácias tripsinizadas foram mantidas a 4 °C e utilizadas em até quatro dias após a sua preparação.

6.2. Preparação dos micoplasmas:

As células de micoplasmas foram preparadas a partir de 30 mL de cultura no meio da fase log de crescimento, determinada por um valor de pH entre 6,8 e 7,2. As culturas foram centrifugadas por 30 min a 12.000 x g, lavadas uma vez com PBS-Glicose 0,5% e ressuspensas em 300 µL desta solução. A concentração de proteínas foi determinada pelo método do ácido bicinônico (Micro BCA Protein Assay Kit, Pierce Inc., Illinois, USA), e a suspensão foi mantida em banho de gelo e utilizada em no máximo 1 hora após a sua preparação.

6.3. Teste de hemólise em tubos:

A suspensão a 2% de hemácias tripsinizadas foi adicionada à uma solução composta de RPMI 1640, HEPES 25 mM, BSA 1%, pH = 7,4, até obter-se uma D.O de cerca de 1,2 à 600 nm. Em tubos contendo 2,9 mL da suspensão de

hemácias nesta solução, foram adicionados 0,1 mL da suspensão de micoplasmas pura e em diluições seriadas de razão 2, até 1/128. Os tubos foram incubados a 37 °C sob agitação por cerca de 16 horas, e a atividade hemolítica foi analisada pela leitura da D.O. das suspensões a 600 nm. A atividade hemolítica foi calculada de acordo com a fórmula: $[(OD_S - OD_E)/(0,5 \times OD_S)]/(T \times mg)$, onde OD_S = densidade ótica a 600 nm no início da incubação, OD_E = densidade ótica a 600 nm no final da incubação, T= tempo da incubação em horas, mg= peso em proteína de micoplasma adicionado à reação.

RESULTADOS

1. Identificação dos DnaA boxes na região *oriC* dos mollicutes:

DnaA boxes têm sido pesquisados por vários grupos pela análise de regiões *oriC* seqüenciadas de mollicutes. Entretanto, estes resultados nunca foram comparados, tampouco obtidos por métodos similares. Deste modo, utilizamos os softwares MEME/MAST para detectar os DnaA boxes de *M. pulmonis* e *M. genitalium*. A validade deste método foi testada primeiramente com as regiões *oriC* de *S. citri* e *M. capricolum*, previamente documentadas. Os sete DnaA boxes previamente descritos na região *oriC* de *S. citri* (YE et al., 1994) foram encontrados permitindo uma diferença de um nucleotídeo com a seqüência consenso para os DnaA boxes de *E. coli* (5'-TTATCCACA-3') (**figura 9**). Usando a mesma estringência, inicialmente foram encontrados cinco dos dez DnaA boxes descritos na região *oriC* de *M. capricolum* (FUJITA et al., 1992). Contudo, reduzindo a estringência e permitindo uma diferença de dois nucleotídeos com a seqüência consenso, todos os DnaA boxes foram encontrados. Estes resultados indicam que este método foi capaz de detectar corretamente os DnaA boxes na região *oriC* dos genomas dos mollicutes.

Nos quatro mollicutes com o genoma seqüenciado (*M. genitalium*, *M. pneumoniae*, *U. urealyticum* e *M. pulmonis*), a região *oriC* não foi localizada experimentalmente, mas várias análises sugerem que a *oriC* esteja localizada, na maioria das bactérias, ao redor do gene *dnaA*. Analisando o genoma de *M. pulmonis*, três possíveis DnaA boxes foram encontrados na região intergênica *dnaA-dnaN*, e cinco foram encontrados na região *recD-dnaA* (**figura 9**).

Figura 9. Representação esquemática dos DnaA boxes identificados em torno do gene *dnaA* de *M. pulmonis*, *M. capricolum* e *M. genitalium*, em comparação com a mesma região de *S. citri*. Os DnaA box com um ou dois nucleotídeos diferentes da sequência consenso 5'-TTATC(C/A)A(C/A)A-3' são indicados por setas cinzas e brancas, respectivamente. Os DnaA box idênticos à sequência consenso são indicados por setas pretas. Os números indicam o tamanho em nucleotídeos dos genes *dnaA* e das regiões intergênicas representadas.

A sequência consenso derivada destes oito DnaA boxes é TTATC(C/A)A(C/A)A, semelhante ao padrão típico TTATCCACA do DnaA box de *E. coli*, com uma variabilidade nas posições seis e oito. Quatro destes DnaA boxes de *M. pulmonis* são idênticos à sequência consenso, e os quatro outros conservam oito dos nove nucleotídeos da sequência de *E. coli*. Quatro sequências adicionais semelhantes foram identificadas dentro do gene *dnaA*. Além disso, duas regiões

ricas em AT, com 31 bp e 39 bp, foram encontradas nas porções intergênicas localizadas nas extremidades 3' e 5' do gene *dnaA*, respectivamente.

Da mesma forma, cinco possíveis DnaA boxes foram localizados na região intergênica *spoJ-dnaA* de *M. genitalium*, e dois possíveis DnaA boxes foram localizados na região intergênica *dnaN-spoJ* (**figura 9**). Apesar destas seqüências não terem sido identificadas nos trabalhos iniciais descrevendo o sequenciamento completo de seu genoma (FRASER et al., 1995), a origem de replicação do cromossomo de *M. genitalium* foi localizada na região intergênica *spoJ-dnaA* por outros autores (LOBRY, 1996).

2. Construção dos plasmídeos pMCO2 e pMCO3, contendo a região *oriC* de *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*:

A clonagem, no vetor pSRT2, do fragmento de 1,97 kb contendo os possíveis DnaA boxes localizados ao redor do gene *dnaA* de *M. capricolum* subsp. *capricolum*, possibilitou a construção de dois novos plasmídeos, pMCO2 e pMCO3. O plasmídeo denominado pMCO2 foi construído apresentando a região *oriC* de *M. capricolum* inserida no sítio *Bam*HI da região de clonagem múltipla, orientada no mesmo sentido do gene *tetM* (**figura 10**).

Figura 10. Representação esquemática da região *oriC* de *M. capricolum* e o fragmento clonado no vetor pSRT2 para a construção do plasmídeo pMCO2. *tetM*: gene de resistência à tetraciclina; PS: promotor do gene da espiralina de *S. citri*, *oriC*: fragmento da origem de replicação cromossômica de *M. capricolum* subsp. *capricolum*.

A construção do plasmídeo denominado pMCO3 foi realizada de maneira semelhante a do plasmídeo pMCO2, porém apresentando o fragmento clonado orientado no sentido inverso ao do *tetM* (**figura 11**).

Figura 11. Mapa do plasmídeo pMCO3. *tetM*: gene de resistência à tetraciclina; PS: promotor do gene da espiralina de *S. citri*, *oriC*: fragmento da origem de replicação cromossômica de *M. capricolum* subsp. *capricolum*.

2.1. Transformação de *M. capricolum* subsp. *capricolum* com os plasmídeos pMCO2 e pMCO3:

A transformação de *M. capricolum* subsp. *capricolum* com 10 µg dos plasmídeos pMCO2 e pMCO3, utilizando a metodologia com polietilenoglicol (PEG), seguida da inoculação destas células transformadas em meio de cultura sólido contendo 2 µg/mL de tetraciclina, permitiu observar, a partir de dois dias de incubação, o aparecimento de pequenas colônias tet^R (**figura 12**). Estas colônias apresentavam um desenvolvimento mais lento em relação às colônias de *M. capricolum* não transformado.

Figura 12. Colônias de *M. capricolum* subsp. *capricolum* não transformado em meio sem antibiótico (A) e transformado com o plasmídeo pMCO2 em meio contendo 2 µg/mL de tetraciclina (B), após 5 dias de cultura. Aumento de 40x.

Nas placas contendo meio de cultura acrescido de tetraciclina, inoculadas com o controle negativo de transformação, não foi observado o crescimento de nenhuma colônia. Utilizando como controle positivo de transformação o plasmídeo pAM120, foi observado o aparecimento de colônias tet^R com uma frequência de 10^{-9} transformantes/CFU/µg de DNA plasmidial.

Para o plasmídeo pMCO2, o rendimento da transformação foi de $1,2 \times 10^{-5}$ transformantes/CFU/µg de DNA plasmidial adicionado, e para o plasmídeo pMCO3, o rendimento foi de $3,7 \times 10^{-4}$ transformantes/CFU/µg de DNA plasmidial. Assim, com a estratégia utilizada, conseguimos obter plasmídeos artificiais contendo o promotor do gene da espiralina de *S. citri*, o determinate *tetM* e a origem de replicação de *M. capricolum*, que são capazes de transformar e de se replicar de forma eficiente neste micoplasma. Deste modo, estes vetores podem se tornar importantes ferramentas para o estudo da função de genes deste micoplasma, especialmente aqueles implicados na patogênese. Além disso, estes experimentos confirmam a localização de região *oriC* de *M. capricolum*, que havia sido teoricamente determinada pela análise da seqüência em torno do gene *dnaA*, e que, conforme demonstramos aqui, apresenta atividade de seqüência replicativa

autônoma (SRA) nas células do micoplasma quando clonada num vetor não replicativo.

Para confirmar a transformação e a presença dos plasmídeos pMCO2 e pMCO3 nas células resistentes à tetraciclina, 10 colônias de cada experimento foram repicadas em meio líquido, e o DNA destas culturas foi analisado por PCR e Southern blotting. Utilizando os *primers* tetL e tetR, foi possível detectar o gene de resistência a tetraciclina, *tetM*, nas culturas transformadas com os plasmídeos pMCO2 e pMCO3. O DNA de *M. capricolum* não transformado apresentou PCR negativa com estes *primers* (**figura 13**).

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose a 1% para análise dos produtos de PCR para detecção do gene *tetM* nas culturas de *M. capricolum* (linhas 1-5) transformado com o plasmídeo pMCO2. P: DNA plasmidial; NT: DNA de *M. capricolum* não transformado; C-: controle negativo de reação. M: Marcador de peso molecular Smartladder (Eurogentec). Os números indicam os tamanhos de cada fragmento em pares de base (bp).

Analizando o DNA das culturas de *M. capricolum* transformado com os plasmídeos pMCO2 e pMCO3 por Southern blotting utilizando uma sonda produzida a partir do gene *tetM*, foi possível também detectar a presença destes plasmídeos nas colônias de micoplasmas tet^R. A digestão do DNA plasmidial com a enzima *Hind*III produziu um fragmento de 3,05 kb que hibridou com uma sonda

tetM (**figura 14**). Estes resultados demonstram que as colônias que se desenvolveram em meio contendo tetraciclina eram resistentes ao antibiótico pela presença do determinante *tetM* expresso pelos plasmídeos, e não por uma eventual mutação espontânea, confirmando a transformação.

Figura 14. Southern blotting utilizando uma sonda tetM com DNA de culturas de *M. capricolum* (linhas 1-6) transformado com o plasmídeo pMCO2, digerido com a enzima *Hind*III. P: DNA plasmidial; NT: DNA de *M. capricolum* não transformado; M: Smartladder (Eurogenetec).

2.2 Transformação de *M. mycoides* subsp. *mycoides* variedade LC com o plasmídeo pMCO2:

Para verificar se plasmídeos contendo a região *oriC* de um micoplasma são capazes de se replicar nas células de um outro micoplasma filogeneticamente muito relacionado, foram feitos experimentos de transformação

de *M. mycoïdes* subsp. *mycoïdes* variedade LC com o plasmídeo pMCO2.

Após dois dias de cultura em meio sólido do produto da transformação de *M. mycoïdes* subsp. *mycoïdes* LC com este plasmídeo foi possível observar o aparecimento de pequenas colônias tet^R. Estas colônias também se desenvolveram mais lentamente em relação às colônias do micoplasma não transformado, e nenhum crescimento foi observado nas placas com meio contendo tetraciclina inoculadas com o controle da transformação. A eficiência da transformação foi de 1×10^{-5} transf./CFU/μg para o plasmídeo pMCO2, em comparação com uma frequência de 10^{-9} transf./CFU/μg de DNA utilizando o plasmídeo pAM120.

A confirmação da transformação foi feita analisando-se por Southern blotting o DNA das culturas de *M. mycoïdes* subsp. *mycoïdes* variedade LC tet^R, utilizando uma sonda produzida a partir do fragmento *oriC* amplificada do plasmídeo pMCO2. A digestão do DNA do plasmídeo pMCO2 com a enzima *Hind*III produziu fragmentos de 4,4 kb e 3,05 kb, e a digestão do DNA genômico de *M. mycoïdes* subsp. *mycoïdes* LC produziu fragmentos de 1,2 kb e 1,8 kb que hibridaram com a sonda *oriC* (**figura 15**). A transformação de *M. mycoïdes* subsp. *mycoïdes* LC type com o plasmídeo pMCO2, que contém a região *oriC* de *M. capricolum*, confirma a habilidade destes vetores de apresentarem atividade de SRA em espécies filogeneticamente relacionadas, ao menos no grupo *Mycoïdes*. Esta propriedade pode se tornar uma vantagem adicional destes plasmídeos nos estudos funcionais do genoma destes mollicutes.

Figura 15. Southern blotting utilizando uma sonda *oriC*, com DNA de culturas de *M. mycoïdes* subsp. *mycoïdes* LC transformado com o plasmídeo pMCO2 (linhas 3-8), digerido com a enzima *Hind*III. P: DNA plasmidial; NT: DNA de *M. mycoïdes* não transformado.

3. Construção dos plasmídeos pMGO1 e pMGO2, contendo a região *oriC* de *Mycoplasma genitalium*:

Clonando os fragmentos amplificados das regiões intergênicas *spoJ-dnaA* e *dnaN-spoJ* de *M. genitalium* no vetor pSRT2, foi possível obter dois novos plasmídeos, um com 6,28 kb denominado pMGO1, e outro de 6,46 kb denominado pMGO2, respectivamente (**figura 16**).

Figura 16. Mapa dos plasmídeos pMGO1 e pMGO2, construído pela inserção da região *oriC* de *M. genitalium* no sítio *Bam*HI do vetor pSRT2. *tetM*: gene de resistência à tetraciclina; PS: promotor do gene da espiralina de *S. citri*.

3.1 Transformação de *M. genitalium* com os plasmídeos pMGO1 e pMGO2:

Com nenhum destes plasmídeos, pMGO1 ou pMGO2, foi possível obter a transformação de *M. genitalium* por eletroporação, não tendo sido observado o aparecimento de colônias *tet*^R mesmo após 8 semanas de incubação das culturas. Várias tentativas de transformação foram realizadas.

4. Transformação de *Mycoplasma pulmonis* com plasmídeos contendo a região *oriC* de *Spiroplasma citri*:

Para verificar se plasmídeos contendo a *oriC* de outra espécie de mollicute seriam capazes de se replicar em *M. pulmonis*, foi utilizado o plasmídeo pBOT1 (Renaudin et al., 1995), que contém um fragmento de 2,0 kb com o gene *dnaA* deste mollicute e as regiões de *DnaA boxes* localizadas à 5' e à 3' do gene.

Foram testadas ainda outras construções não publicadas, contendo fragmentos reduzidos desta *oriC*, que se mostraram capazes de replicar em *S. citri*. Entretanto, com nenhum destes plasmídeos foi possível transformar *M. pulmonis*, tanto por eletroporação quanto pela metodologia do PEG, mesmo após várias tentativas. Estes resultados demonstram a necessidade de se construir vetores contendo a região *oriC* do próprio micoplasma, para os experimentos de transferência de material genético.

5. Construção do plasmídeo pMPO1, contendo a região *oriC* de *Mycoplasma pulmonis*:

Do mesmo modo como foi feito para as espécies mencionadas anteriormente, clonando-se o fragmento contendo os possíveis DnaA boxes de *M. pulmonis* UAB CTIP no vetor pSRT2, foi possível obter um novo plasmídeo de 7,4 kb, denominado pMPO1. Este plasmídeo contém a provável região *oriC* de *M. pulmonis* inserida no sítio *Bam*HI da região de clonagem múltipla, orientada no mesmo sentido do gene *tetM* (figura 17).

Figura 17. Mapa do plasmídeo pMPO1, construído pela inserção da região *oriC* de *M. pulmonis* no sítio *Bam*HI do vetor pSRT2. *tetM*: gene de resistência à

tetraciclina; PS: promotor do gene da espiralina de *S. citri*.

5.1 Transformação de *M. pulmonis* com o plasmídeo pMPO1:

A transformação de *M. pulmonis* com 10 µg do plasmídeo pMPO1 por PEG, possibilitou a observação, após três dias de incubação, do aparecimento de pequenas colônias tet^R (**figura 18**). Estas colônias apresentaram um desenvolvimento mais lento em relação às colônias do micoplasma não transformado. Nenhuma colônia foi observada nas placas com meio contendo tetraciclina inoculadas com o controle negativo de transformação.

Figura 18. Colônias de *M. pulmonis* não transformado (A) e transformado com o plasmídeo pMPO1 (B), após 5 dias de cultura em meio Hayflick N sólido. Aumento de 40x.

O rendimento da transformação de *M. pulmonis* com o plasmídeo

pMPO1 foi de 3×10^{-6} transf./CFU/ μ g de DNA plasmidial adicionado. Utilizando o plasmídeo pAM120, foi possível observar o aparecimento de colônias tet^R com uma frequência de 10^{-9} transf./CFU/ μ g de DNA.

A confirmação da transformação foi feita por Southern blotting com uma sonda tetM. A digestão do DNA plasmidial com a enzima *Eco*RI produziu um fragmento de 7,4 kb que hibridou com uma sonda tetM (**figura 19**). Estes resultados demonstram que as colônias que se desenvolveram em meio contendo tetraciclina eram resistentes ao antibiótico pela presença do determinante *tetM* expresso pelos plasmídeos. Nenhuma hibridação foi observada com o DNA de *M. pulmonis* não transformado.

Figura 19. Southern blotting com DNA de culturas de *M. pulmonis* transformado com o plasmídeo pMPO1 (linhas 1-16), após 2 passagens em meio líquido. O DNA foi digerido com *Eco*RI e hibridado com uma sonda tetM. NT: DNA de *M. pulmonis* não transformado; P: DNA plasmidial.

5.2 Verificação do comportamento do plasmídeo pMPO1:

Para verificar se o plasmídeo pMPO1 sofre integração no cromossomo de *M. pulmonis* por recombinação homóloga com a região *oriC*, o DNA de culturas de micoplasma transformado com este vetor foi analisado por Southerblot com uma sonda *oriC*, produzida por PCR a partir do plasmídeo pMPO1. Após digestão do DNA com a enzima *Hind*III, esta sonda irá hibridizar com um fragmento de 7,0 kb caso o plasmídeo permaneça livre, e com um

fragmento de 3,7 kb caso a região *oriC* cromossômica não apresente o plasmídeo inserido. Por outro lado, ocorrendo a integração do plasmídeo artificial na região *oriC* do micoplasma, serão observados dois fragmentos *HindIII* de tamanho diferente: 4,0 e 6,7 kb, de acordo com o esquema representado na **figura 20**.

Figura 20. Representação esquemática da integração do plasmídeo pMPO1 na região *oriC* do cromossomo de *M. pulmonis* com um único *crossing-over*. Os números indicam o tamanho dos fragmentos que hibridam com a sonda *oriC*, após digestão do DNA com a enzima *HindIII* (figura não desenhada em escala).

Pelo padrão de hibridação observado entre sonda *oriC* e o DNA das culturas de *M. pulmonis* transformado com o plasmídeo pMPO1, pudemos observar que o vetor começa a integrar-se, por recombinação homóloga na região *oriC* do cromossomo do micoplasma, aparentemente a partir da segunda passagem em meio líquido após a transformação, ao menos em algumas culturas (**figura 21**).

Figura 21. Southern blotting com DNA de duas culturas de *M. pulmonis* transformado com o plasmídeo pMPO1, após 2 (linhas 1 e 3) e 5 (linhas 2 e 4) passagens em meio líquido. O DNA foi digerido com *Hind*III e hibridado com uma sonda oriC. NT: DNA de *M. pulmonis* não transformado; P: DNA plasmidial.

Outras enzimas foram utilizadas para a digestão do DNA das culturas de *M. pulmonis* transformado com o plasmídeo pMPO1, como *Eco*RI e *Xba*I, e os resultados obtidos foram semelhantes.

6. Construção dos plasmídeos pMPO2, pMPO3, pMPO4 e pMPO5, pela redução do fragmento responsável pela replicação autônoma dos plasmídeos em *M. pulmonis*:

Amplificando um fragmento de 327 bp contendo os DnaA boxes localizados na região intergênica *dnaA-dnaN* de *M. pulmonis* e clonando-o no vetor pSRT2, foi possível construir um novo plasmídeo com 5,83 kb, denominado pMPO2. Do mesmo modo, clonando-se no vetor pSRT2 um fragmento de 262 bp contendo os DnaA boxes localizados na região intergênica *recD-dnaA*, foi possível construir um novo plasmídeo com 5,76 kb, denominado pMPO3. O plasmídeo pMPO4, com 6,09 kb, foi construído clonando-se estes dois fragmentos lado a lado

no sítio *Bam*HI do vetor pSRT2. O plasmídeo pMPO5, também com 6,09 kb, foi construído clonando-se estes dois fragmentos espaçados pelo gene *tetM*, conforme ilustrado na **figura 22**.

Figura 22. Representação esquemática da região *oriC* de *M. pulmonis* e os diferentes plasmídeos construídos neste trabalho (figura não desenhada em escala). O plasmídeo pMPO1 foi construído clonando-se o fragmento de 1,9 kb contendo a região *oriC* no sítio *Bam*HI do vetor pSRT2. Os plasmídeos pMPO2 e pMPO3 foram construídos clonando-se as regiões de *DnaA* boxes localizadas nas extremidades 5' e 3' do gene *dnaA*, respectivamente, no sítio *Bam*HI do vetor pSRT2. O plasmídeo pMPO4 foi construído clonando-se estes dois fragmentos lado a lado no sítio *Bam*HI do vetor pSRT2, e o plasmídeo pMPO5 foi construído clonando-se estes dois fragmentos espaçados pelo *tetM* no sítio *Bam*HI do vetor

pSRT2.

6.1 Transformação de *M. pulmonis* com os plasmídeos contendo a região *oriC* reduzida:

Após a transformação de *M. pulmonis* com PEG utilizando os plasmídeos pMPO2 e pMPO3, que contém, respectivamente, somente os DnaA *boxes* localizados nas regiões intergênicas *dnaA-dnaN* e *recD-dnaA* do micoplasma, não foi possível observar o aparecimento de colônias tet^R, mesmo após várias tentativas. Do mesmo modo, não foi possível obter transformantes utilizando o plasmídeo pMPO4, que contém estes dois fragmentos clonados lado a lado. Por outro lado, utilizando o plasmídeo pMPO5, que contém estes dois fragmentos espaçados pelo gene *tetM*, após cinco dias de cultura em meio sólido já foi possível observar o aparecimento de pequenas colônias tet^R. O rendimento da transformação foi de 4×10^{-6} transformantes/cfu/ μ g de DNA plasmidial adicionado. Estas colônias desenvolviam-se mais lentamente em meio seletivo em comparação com as colônias obtidas pela transformação com o plasmídeo pMPO1, mesmo nas passagens em meio líquido. Estes resultados aparentemente demonstram que as duas regiões contendo os DnaA *boxes* de *M. pulmonis* são necessárias para a replicação do plasmídeo artificial, e que a organização e a distribuição espacial destas regiões no vetor são importantes para o reconhecimento destas seqüências como uma SRA pela proteína *dnaA* na replicação do DNA plasmidial.

Para confirmar a transformação de *M. pulmonis* com o plasmídeo pMPO5, algumas colônias tet^R foram repicadas em meio líquido e seu DNA foi analisado por Southern blotting com uma sonda *oriC*, produzida a partir do plasmídeo pMPO1. Após digestão do DNA plasmidial e cromossômico com a enzima *EcoRI*, observou-se um fragmento de 6,09 kb e outro de 6,75 kb que hibrida com esta sonda, respectivamente. Caso o plasmídeo pMPO5 sofresse integração na região *oriC* com um único *crossing-over*, deveria, ser observados fragmentos de tamanhos diferentes na hibridação, conforme ilustrado na **figura 23**. Contudo, se eventualmente ocorresse um *crossing-over* duplo entre os dois

fragmentos clonados no plasmídeo e a região *oriC*, o gene *dnaA* seria substituído no cromossomo pelo gene *tetM* do plasmídeo, evento que provavelmente seria letal para a célula. Além disso, mesmo ocorrendo um *crossing-over* único, apesar de não haver a interrupção do gene *dnaA*, a integração do plasmídeo nas regiões intergênicas *redD-dnaA* ou *dnaA-dnaN* poderia causar uma alteração na estrutura da *oriC* de *M. pulmonis*, afetando a replicação normal no cromossomo do micoplasma.

Figura 23. Representação esquemática dos possíveis resultados da integração do plasmídeo pMPO5 na região *oriC* do cromossomo de *M. pulmonis* com um único *crossing-over*. Os números indicam o tamanho dos fragmentos que hibridam com uma sonda *oriC*, após digestão do DNA com a enzima *EcoRI* (figura não desenhada em escala).

Pelo padrão de hibridação observado entre a sonda *oriC* e o DNA

das culturas de *M. pulmonis* transformado com o plasmídeo, pudemos observar que o vetor não sofre integração no cromossomo do micoplasma, permanecendo livre na célula ao menos até a 15ª passagem em meio líquido após a transformação (**figura 24**). Esta propriedade é bastante interessante, pois pode facilitar a integração no gene alvo de um vetor de dirupção baseado no plasmídeo pMPO5, em comparação com vetores de dirupção baseados no plasmídeo pMPO1.

Figura 24. Southern blotting e hibridação de clones de *M. pulmonis* transformados com o plasmídeo pMPO5 (linhas 1-5) após 15 passagens em meio líquido. O DNA foi digerido com *EcoRI* e hibridado com uma sonda *oriC*. Linha NT: DNA de *M. pulmonis* não transformado; P: DNA plasmidial.

Outro achado que confirma a hipótese de que o plasmídeo pMPO5 é mantido em sua forma livre no citoplasma da célula do micoplasma, é o fato de ter sido possível recuperar este vetor das células transformadas pela mesma metodologia de extração de plasmídeos aplicada para *E. coli*. Além disso, foi possível também recuperar o plasmídeo pMPO1 das células de *M. pulmonis* transformadas anteriormente (**figura 25**). Isto indica que, apesar de sofrer integração rapidamente no genoma de *M. pulmonis* por recombinação homóloga com a região *oriC*, estes vetores são replicados em grande quantidade no citoplasma.

Figura 25. Eletroforese em gel de agarose a 1% de DNA do plasmídeo pMPO1, extraído de culturas de *M. pulmonis* em 2 e 5 passagens após a transformação com este vetor (linhas 2 e 3), em comparação com o DNA do plasmídeo original (linhas 1). O DNA foi digerido com as enzimas *EcoRI*, *BamHI*, e *HindIII*. M: Smartladder (Eurogenetec).

6.2 Verificação da estabilidade dos plasmídeos pMPO1 e pMPO5:

Para verificar se os plasmídeos replicativos podem ser

naturalmente mantidos pela célula do micoplasma, três clones de *M. pulmonis* transformados com o plasmídeo pMPO1 e três clones transformados com o plasmídeo pMPO5 foram submetidos a 1, 5, 10 e 15 passagens sem tetraciclina no meio de cultura. Após estas passagens, 20 µL destas culturas puras e diluídas à 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} , foram inoculadas em meio sólido sem tetraciclina e também em meio com tetraciclina a 2 µg/ml, para a determinação da percentagem de células, representada pelo número de colônias, que manteve a resistência ao antibiótico, e conseqüentemente manteve o plasmídeo após as diferentes passagens sem pressão seletiva. Após uma passagem sem tetraciclina, os clones transformados com os plasmídeos pMPO1 e pMPO5 mantiveram cerca de 40% de suas células, representada pelo número de colônias, resistentes à tetraciclina. Para os clones transformados com o plasmídeo pMPO1, de acordo com o esperado, a percentagem de colônias que manteve a resistência à tetraciclina foi aumentando para 80% após 5 passagens sem pressão seletiva, chegando a 100% após as demais passagens. Este fato era esperado pela integração do plasmídeo pMPO1 no cromossomo de *M. pulmonis*, o que torna as células intrinsecamente resistentes ao antibiótico. Este experimento demonstra também que esta integração é muito rápida, podendo chegar a 100% das células para alguns clones, após 5 passagens. Por outro lado, para os clones transformados com o plasmídeo pMPO5, após 5 passagens a percentagem de células resistentes à tetraciclina caiu abruptamente, ficando em cerca de 4%, e chegando praticamente à zero após as passagens seguintes. Estes resultados confirmam também que o plasmídeo pMPO5 não sofre integração no genoma de *M. pulmonis*. A eliminação do plasmídeo pelas células do micoplasma ao longo das passagens provavelmente se deve a uma incompatibilidade entre a *oriC* presente no cromossomo e a SRA presente no plasmídeo. Estes resultados estão resumidos na **tabela II** e graficamente representados na **figura 26**.

Tabela II. Média da percentagem de colônias dos clones transformados com os plasmídeos pMPO1 e pMPO5 que mantiveram a resistência à tetraciclina após 1, 5, 10 e 15 passagens sem pressão seletiva (P). SD: desvio padrão.

	1 P	5 P	10 P	15 P
pMPO1	45,0%	74,0%	93,0%	100,0%
pMPO5	41,6%	4,1%	<0,1%	<0,1%
SD pMPO1	+/- 30,4%	+/- 30,9%	+/- 11,5%	0
SD pMPO5	+/- 30,7%	+/- 5,3%	0	0

Figura 26. Representação gráfica da média da porcentagem de colônias dos clones transformados com os plasmídeos pMPO1 e pMPO5 que mantiveram a resistência à tetraciclina após 1, 5, 10 e 15 passagens sem pressão seletiva (P).

7. Dirupção do gene da hemolisina A de *M. pulmonis* com o uso dos plasmídeos replicativos artificiais construídos:

Amplificando um fragmento interno de 717 bp do gene da hemolisina A de *M. pulmonis* e inserindo-o nos plasmídeos pSRT2, pMPO1 e pMPO5, foi possível obter os vetores de dirupção denominados pSRT2- $\Delta hlyA$,

pMPO1- $\Delta hlyA$ e pMPO5- $\Delta hlyA$, respectivamente. O resultado da construção destes dois últimos plasmídeos está representada na **figura 27**.

Figura 27. Representação dos vetores de dirupção pMPO1- $\Delta hlyA$ e pMPO5- $\Delta hlyA$ construídos, com os sítios de restrição e a orientação dos fragmentos clonados.

7.1 Transformação de *M. pulmonis* com os vetores pSRT2- $\Delta hlyA$, pMPO1- $\Delta hlyA$ e pMPO5- $\Delta hlyA$:

Após a transformação de *M. pulmonis* com os plasmídeos pMPO1- $\Delta hlyA$ e pMPO5- $\Delta hlyA$ foi possível obter colônias resistentes à tetraciclina com o mesmo rendimento obtido pela transformação do micoplasma com os plasmídeos replicativos sem o inserto do fragmento do gene alvo. Por outro lado, transformando *M. pulmonis* com o vetor pSRT2- $\Delta hlyA$, que foi construído clonando-se a porção central do gene da hemolisina A no vetor pSRT2 e que não apresenta a origem de replicação cromossômica do micoplasma, não foi possível observar o aparecimento de colônias tet^R, mesmo após várias tentativas. Como este vetor não se replica em *M. pulmonis*, o tamanho reduzido do fragmento do gene clonado aparentemente não possibilitou que o plasmídeo se integrasse no cromossomo logo após a transformação, possibilitando o eventual desenvolvimento de colônias tet^R. Este fato denota a importância da construção de plasmídeos replicativos para o estudo funcional de genes dos micoplasmas.

7.2 Verificação da integração dos plasmídeos pMPO1- $\Delta hlyA$ e pMPO5- $\Delta hlyA$ no gene alvo:

Algumas colônias de *M. pulmonis* transformado com os plasmídeos pMPO1- $\Delta hlyA$ e pMPO5- $\Delta hlyA$ foram repicadas em meio líquido contendo tetraciclina, durante várias passagens. A interrupção do gene da hemolisina A pela integração dos vetores no gene alvo foi testada inicialmente por duas estratégias: análise do DNA por Southern blotting e amplificação pela PCR.

7.2.1 Southern blotting:

A verificação da integração dos plasmídeos pMPO1- $\Delta hlyA$ e pMPO5- $\Delta hlyA$ no gene alvo foi feita pela análise do perfil de restrição do DNA das

culturas de *M. pulmonis* transformado com estes vetores, por digestão com a enzima *Hind*III e hibridação com uma sonda *hlyA* (produzida com os *primers* HE1 e HE2 a partir do plasmídeo pMPO1- Δ *hlyA*). O DNA destas culturas foi analisado em 5, 10, 15, 20, 25 e 30 passagens após a transformação. Com a integração do plasmídeo pMPO1- Δ *hlyA* no gene alvo, foram observados dois fragmentos *Hind*III de 5,7 e 5,9 kb que hibridaram com a sonda *hlyA*, em comparação com um fragmento de 7,1 kb correspondendo ao DNA plasmidial e outro de 4,0 kb correspondendo ao gene intacto, caso a integração não ocorresse (**figura 28**).

Figura 28. Representação esquemática do vetor de dirupção pMPO1- Δ *hlyA* e sua integração no gene da hemolisina A de *M. pulmonis*. Os números indicam o tamanho dos fragmentos *Hind*III que hibridam com uma sonda *hlyA*.

Do mesmo modo, com a integração do plasmídeo pMPO5- Δ *hlyA* no gene alvo, foram observados dois fragmentos *Hind*III de 4,8 e 5,5 kb que hibridaram com a sonda *hlyA*, em comparação com um fragmento de 6,2 kb

correspondendo ao DNA plasmidial e outro de 4,0 kb correspondendo ao gene intacto, caso não houvesse integração (**figura 29**). Assim, com a inserção dos vetores de dirupção por um único *crossing-over*, o cromossomo do micoplasma apresentou duas cópias do gene alvo, porém, uma cópia com uma deleção de 17 nucleotídeos de sua extremidade 3', e a outra cópia com uma deleção de 39 nucleotídeos de sua extremidade 5'.

Figura 29. Representação esquemática do vetor de dirupção pMPO5-ΔhlyA e sua integração no gene da hemolisina A de *M. pulmonis*. Os números indicam o tamanho dos fragmentos *HindIII* que hibridam com uma sonda *hlyA*.

Analisando o padrão de hibridação de culturas de *M. pulmonis* transformadas com o plasmídeo pMPO1-ΔhlyA utilizando a sonda *hlyA*, até a 30ª passagem (P30) não houve evidências que demonstrassem claramente a integração do vetor de dirupção no gene da hemolisina A (**figura 30**). Entretanto, em alguns casos, a partir da 15ª passagem pode ser observado o desaparecimento

gradual do fragmento de 4,0 kb, que corresponde ao gene intacto, podendo indicar a dirupção do gene alvo. Entretanto, o aparecimento dos dois fragmentos de 5,7 e 5,9 kb correspondendo ao gene da hemolisina A rompido pela integração do plasmídeo pMPO1- $\Delta hlyA$ não ficou muito claro. Este discreto desaparecimento do fragmento de 4,0 kb pode indicar realmente a dirupção do gene, que entretanto parece acontecer com uma frequência muito baixa, dificultando sua clara detecção por Southern blotting.

Figura 30. Southern blotting com DNA digerido pela enzima *HindIII*, de culturas de

M. pulmonis transformadas com a plasmídeo pMPO1- $\Delta hlyA$ (linhas 1 a 6) após 10 (A), 20 (B) passagens em meio líquido, usando a sonda *hlyA*. NT: DNA de *M. pulmonis* não-transformado; P: DNA plasmidial; ndp: DNA plasmidial não digerido.

Da mesma forma, verificando o padrão de hibridação de culturas de *M. pulmonis* transformadas com a plasmídeo pMPO5- $\Delta hlyA$ usando a sonda *hlyA*, até a 30ª passagem não houve evidências claras da integração do vetor de dirupção no gene alvo (**figura 31**). Entretanto, como observado com o plasmídeo pMPO1- $\Delta hlyA$, a partir de 15P pode-se observar o desaparecimento gradual do fragmento de 4,0 kb correspondendo ao gene intacto. Entretanto, o aparecimento dos fragmentos esperados de 4,8 e 5,5 kb com a dirupção do gene pelo plasmídeo pMPO5- $\Delta hlyA$ também não ficou muito claro.

Figura 31. Southern blotting com DNA digerido pela enzima *Hind*III, de culturas de *M. pulmonis* transformadas com a plasmídeo pMPO5- Δ *hlyA* (linhas 1 a 6) após 10 (A) e 20 (B) passagens em meio líquido, usando uma sonda *hlyA*. NT: DNA de *M. pulmonis* não-transformado; P: DNA plasmidial; ndp: DNA plasmidial não digerido.

Deste modo, pela dificuldade em observar a dirupção do gene da hemolisina A de *M. pulmonis* por Southern blotting, outras estratégias para obtenção de uma cultura de micoplasma mutante se fizeram necessárias.

7.2.2 Amplificação pela PCR:

Outra maneira de verificar se os vetores de dirupção pMPO1- $\Delta hlyA$ e pMPO5- $\Delta hlyA$ integraram-se no gene alvo foi através da PCR. Com o plasmídeo pMPO1- $\Delta hlyA$ integrado no gene da hemolisina A de *M. pulmonis*, deveríamos ter uma amplificação positiva de um produto de cerca de 1,2 kb com os uso dos *primers* HEL e OR3, onde um *primer* reconhece uma seqüência existente somente no cromossomo do micoplasma, e o outro *primer* reconhece uma seqüência existente somente no plasmídeo (**figura 32**). A seqüência reconhecida pelo *primer* OR3 na região *oriC* de *M. pulmonis* está muito distante da região reconhecida pelo *primer* HEL (179 kb), para produzir a amplificação de um fragmento de tamanho semelhante ao esperado caso o plasmídeo não esteja integrado no gene alvo.

Figura 32. Representação esquemática da integração do vetor de dirupção pMPO1- $\Delta hlyA$ no gene da hemolisina A de *M. pulmonis*, e a posição dos *primers* HEL e OR3 que produzem um fragmento amplificado de 1,2 kb somente se o plasmídeo estiver inserido nesta região. Com a dirupção por esta estratégia, o micoplasma apresenta duas cópias do gene, uma apresentando uma deleção em sua extremidade 3', e outra apresentando uma deleção em sua extremidade 5', pela recombinação do fragmento interno clonado no plasmídeo com o seu gene alvo.

Da mesma forma, com a inserção do plasmídeo pMPO5- $\Delta hlyA$ no gene alvo, deveríamos ter uma amplificação positiva de um produto de cerca de 1,05 kb com os uso dos *primers* OR2 e HER, onde um *primer* reconhece uma seqüência existente no cromossomo do micoplasma, e o outro *primer* reconhece uma seqüência existente no plasmídeo (**figura 33**).

Figura 33. Representação esquemática da integração do vetor de dirupção pMPO5- $\Delta hlyA$ no gene da hemolisina A de *M. pulmonis*, e a posição dos *primers* OR2 e HER que produzem um fragmento amplificado de 1,05 kb somente se o plasmídeo estiver inserido nesta região.

Os resultados observados após a amplificação do DNA de culturas de *M. pulmonis* transformado com os plasmídeos pMPO1- $\Delta hlyA$ e pMPO5- $\Delta hlyA$ após duas passagens em meio líquido, permitiram observar a integração dos vetores de dirupção no gene alvo (**figura 34**). Entretanto, as culturas dos micoplasmas continuaram apresentando PCR positiva com os *primers* HEL e HER, demonstrando a presença de células com o gene da hemolisina A ainda intacto (**figura 35**), mesmo após o isolamento de colônias do micoplasma por filtração.

Figura 34. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR de *M. pulmonis* transformado com os plasmídeos pMPO1- $\Delta hlyA$ (A, linhas 1-8) e pMPO5- $\Delta hlyA$ (B, linhas 1-6), utilizando os *primers* OR3 e HEL e os *primers* OR2 e HER, respectivamente. CN: controle negativo de reação; NT: DNA de *M. pulmonis* não

transformado; P: DNA plasmidial; M: Smartladder (Eurogentec) (**A**) ou 100 bp DNA Ladder (Gibco) (**B**).

Figura 35. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR de *M. pulmonis* transformado com o plasmídeo pMPO1- $\Delta hlyA$ (**A**, linhas 1-10) e pMPO5- $\Delta hlyA$ (**B**, linhas 1-8), utilizando os *primers* HEL e HER. NT: DNA de *M. pulmonis* não transformado; P: DNA plasmidial; M: 100 bp DNA ladder (Gibco).

Apesar da especificidade com que estes *primers* reconhecem suas seqüências alvo, foram analisados os perfis de restrição dos produtos de PCR para a detecção da integração do vetor de dirupção pMPO5- $\Delta hlyA$ no gene da hemolisina A de *M. pulmonis*. Por digestão com a enzima *Bam*HI, o produto de PCR de 1,05 kb produz fragmentos de 0,25 kb e 0,8 kb (**figura 36**).

Figura 36. Digestão dos produtos de PCR para a detecção da integração do vetor de dirupção no gene da hemolisina A em culturas de *M. pulmonis* transformadas com o plasmídeo pMPO5- Δ hlyA (linhas 1-3), utilizando a enzima de restrição *Bam*HI. NT: DNA de *M. pulmonis* não transformado; M: 100 bp DNA ladder (Gibco).

Da mesma maneira, a digestão dos produtos de PCR com os *primers* HEL e HER, que produzem um fragmento de 1,05 kb caso o gene da hemolisina A de *M. pulmonis* permaneça íntegro, deve produzir fragmentos de 0,17 kb, 0,38 kb e 0,47 kb utilizando a enzima de restrição *Hin*fl. Os resultados obtidos confirmam a especificidade desta reação (**figura 37**).

Figura 37. Digestão dos produtos de PCR obtidos com os *primers* HEL e HER (linhas 1-3), que produzem um fragmento de 1,05 kb caso o gene da hemolisina A de *M. pulmonis* permaneça íntegro, utilizando a enzima de restrição *Hin*fl. NT:

Produto de PCR com DNA de *M. pulmonis* não transformado; M: 100 bp DNA ladder (Gibco).

7.3 Recuperação de clones de *M. pulmonis* com o gene *hlyA* inativado por integração do plasmídeo pMPO5- Δ *hlyA*, através do uso de sua propriedade de instabilidade:

Para tentar aumentar as chances de recuperar um clone purificado de *M. pulmonis* mutante, foram feitas algumas passagens em meio líquido sem tetraciclina, de culturas transformadas com o vetor pMPO5- Δ *hlyA*, que em seguida foram inoculadas em meio contendo tetraciclina a 5 µg/mL. Sem a pressão seletiva, como havia sido demonstrado, as células do micoplasma tendem a perder o plasmídeo, e assim existiria uma maior possibilidade de se recuperar células que são resistentes à tetraciclina pela integração do vetor no gene alvo. Verificando o padrão de hibridação do DNA destas culturas com a sonda *hlyA* como descrito anteriormente, foi possível observar o aparecimento dos dois fragmentos de 4,8 e 5,5 kb correspondendo à dirupção do gene da hemolisina A. O aparecimento destes fragmentos ficou claro após 5 passagens sem pressão seletiva (**figura 38**). Entretanto, ainda pudemos observar a presença do fragmento de 4,0 kb correspondendo ao gene intacto. Parece claro a ocorrência de uma população mista de células mutantes e células com o gene normal.

Figura 38. Southern blotting com DNA digerido pela enzima *Hind*III, de clones de *M. pulmonis* transformados com plasmídeo pMPO5- Δ *hlyA* (linhas 3 a 7) após 5 passagens em meio líquido sem tetraciclina, usando a sonda *hlyA*. NT: DNA de *M. pulmonis* não-transformado; P: DNA plasmidial; ndp: DNA plasmidial não digerido.

Foi analisado também o padrão de hibridação destas culturas após

10P e 15P sem tetraciclina, o qual apresentou resultados semelhantes. Na tentativa de obtenção de uma colônia pura de micoplasma com o gene mutado, após estas diferentes passagens sem tetraciclina, foi feita uma clonagem por filtração com membrana de 45 μ m como descrito no item 1.1.2 da seção Material e Métodos. Várias colônias foram repicadas, e testadas por PCR com os *primers* OR2 e HER, que produzem um fragmento amplificado de 1,05 kb caso o vetor pMPO5- $\Delta hlyA$ esteja integrado no gene alvo. (figura 39).

Figura 39. PCR com os *primers* OR2 e HER (a), que produzem um fragmento amplificado de 1,05 kb em caso de integração do vetor pMPO5- $\Delta hlyA$ no gene alvo, e HEL e HER (b), que amplificam um fragmento de 1,05 kb com o gene *hlyA* intacto. As amostras testadas (1-3) são culturas de *M. pulmonis* transformadas com o plasmídeo pMPO5- $\Delta hlyA$ submetidas a 15 passagens sem tetraciclina. M: 100 bp DNA ladder (Gibco BRL); NT: DNA de *M. pulmonis* não-transformado; P: plasmídeo pMPO5- $\Delta hlyA$; CN: controle negativo de reação ; NT-P: mistura de 50 ng de DNA de *M. pulmonis* não-transformado e 2 ng de DNA plasmidial, amplificados com os *primers* OR2 e HER.

Estes resultados confirmam mais uma vez a dirupção do gene da hemolisina A de *M. pulmonis* utilizando vetores baseados nos plasmídeos replicativos artificiais contendo a região *oriC* do micoplasma. Entretanto, utilizando os *primers* HEL e HER, que produzem um fragmento de 1,05 kb caso o gene da hemolisina A de *M. pulmonis* permaneça sem a inserção do vetor, como descrito

anteriormente, verificamos que todas as colônias ainda constituíam-se de uma mistura de células mutadas e de células contendo o gene alvo intacto.

7.4 Teste de hemólise em tubos para *M. pulmonis*:

Para verificar se a dirupção do gene da hemolisina A de *M. pulmonis* poderia ser notada por uma queda da atividade hemolítica das células do micoplasma, foram analisadas culturas transformadas com o vetor de dirupção pMPO5- $\Delta hlyA$, em 20P e em 30P após a transformação (**figura 40**). Os resultados das Δ D.O. a 600 nm de cada cultura estão relatados na **tabela VI** (Anexos).

Figura 40. Curva de atividade hemolítica de células de micoplasma, representada pela diferença entre a D.O. inicial a 600 nm e a D.O. após a incubação (Δ D.O.) de uma suspensão de eritrócitos com diferentes quantidades de micoplasma (definidas em μ g de proteína). A quantidade de eritrócitos lisados ao final da incubação é diretamente proporcional à Δ D.O. resultante. NT P5 : cultura de *M. pulmonis* não transformado com 5 passagens em meio de cultura ; NT P30 : cultura de *M. pulmonis* não transformado com 30 passagens; 7- pMPO5- $\Delta hlyA$ P20: cultura de *M. pulmonis* transformado com o vetor pMPO5- $\Delta hlyA$ com 20 passagens após a transformação; 7- pMPO5- $\Delta hlyA$ P30: cultura de *M. pulmonis* transformado com o

vetor pMPO5- $\Delta hlyA$ em 30 passagens após a transformação.

Como pode ser notado, não há uma queda da atividade hemolítica das culturas transformadas com o vetor de dirupção, em relação às culturas de *M. pulmonis* não transformadas. Um resultado semelhante foi obtido analisando-se culturas que foram submetidas a 15 passagens sem tetraciclina e selecionadas em meio contendo antibiótico, na tentativa de aumentar a probabilidade de se recuperar um clone puro de micoplasma com o gene da hemolisina A mutado (**figura 41**). Os resultados das Δ D.O. a 600 nm de cada cultura estão relatados na **tabela VII** (Anexos).

Figura 41. Curva de atividade hemolítica de células de micoplasma, representada pela diferença entre a D.O. inicial a 600 nm e a D.O. após a incubação de uma suspensão de eritrócitos com diferentes quantidades de micoplasma (definidas em μ g de proteína). NT P5 : cultura de *M. pulmonis* não transformado em 5 passagens após o seu isolamento de camundongo infectado ; NT P24 : cultura de *M. pulmonis* não transformado em 24 passagens após o seu isolamento ; 27.22 P24: cultura de *M. pulmonis* transformado com o vetor pMPO5- $\Delta hlyA$ em 24 passagens após a transformação.

Aplicando a fórmula para determinar a atividade hemolítica, em nossos experimentos, obtivemos uma atividade média de 5,0 +/- 0,89. Os resultados individuais das atividades hemolíticas das culturas analisadas estão representados na **tabela III**. Para os cálculos, foram consideradas as menores quantidades de proteína que produziram o maior grau de hemólise no teste.

Tabela III. Resultados das atividades hemolíticas das culturas de *M. pulmonis* transformadas com o vetor de dirupção pMPO5- $\Delta hlyA$, em 20 (7-pMPO5- $\Delta hlyA$ P20) ou 30 passagens após a transformação (7-pMPO5- $\Delta hlyA$ P30), ou em 24 passagens após a transformação, selecionadas após 15 passagens sem tetraciclina (27.22 P24). Os testes foram realizados em duplicata. NT P5: cultura de *M. pulmonis* não transformado com cinco passagens em meio artificial; NT P30: cultura de *M. pulmonis* não transformado com 30 passagens em meio artificial.

	NT P5	NT P30	7-pMPO5-DhlyA P20	7-pMPO5-DhlyA P30	27.22 P24	media	SD
Atividade Hemolitica	4,4	5,2	4,5	4,8	6,1	5	0,69

DISCUSSÃO

Nos últimos anos, o seqüenciamento completo dos genomas dos micoplasmas vem possibilitando a aquisição de uma grande quantidade de informação sobre a biologia e patogenicidade destes microrganismos. Além disso, o sequenciamento do genoma de microrganismos como *M. pulmonis* abre caminho para os estudos de genômica funcional, pela possibilidade da utilização deste patógeno murino como um modelo infecções respiratórias por micoplasmas (CASSELL, 1982; SIMEKA et al., 1992).

Os estudos de transferência de genes nos mollicutes têm sido dificultados pela ausência de sistemas adequados de transformação das células destes microrganismos. Grandes perspectivas neste sentido foram abertas pelos trabalhos pioneiros de clonagem da região *oriC* do mollicute *S. citri*, e sua utilização em plasmídeos artificiais para a transformação do microrganismo (RENAUDIN et al., 1995; YE et al., 1994). Recentemente, esta estratégia foi aplicada com sucesso em outra bactéria, *Xylella fastidiosa*, cujo sequenciamento completo do genoma foi de grande importância para a ciência brasileira (MONTEIRO et al., 2001).

Entretanto, os trabalhos de identificação das regiões *oriC* nas diferentes bactérias nunca foram comparados, tampouco obtidos por métodos similares. A utilização dos softwares MEME/MAST para detectar os DnaA boxes foi validada com a análise das regiões *oriC* de *S. citri* e *M. capricolum*, previamente documentadas.

No presente trabalho, a comparação das possíveis *oriC* dos mollicutes indicou uma ausência de conservação da ordem dos genes usualmente encontrados nesta região. Em *S. citri*, *M. capricolum* e *M. pulmonis* somente a

posição dos genes *dnaN-dnaA* em seqüência foi conservada. Por outro lado, estes genes são divergentes e espaçados pelo gene *spoJ* em *M. genitalium*. Utilizando os softwares desenvolvidos para encontrar seqüências conservadas, foi possível localizar DnaA boxes potenciais ao redor do gene *dnaA*. A distribuição dos possíveis DnaA boxes foi semelhante em *S. citri*, *M. capricolum* e *M. pulmonis*, com exceção de *M. genitalium*.

A caracterização funcional destas *oriC* foi obtida para *M. pulmonis* e *M. capricolum*, com a construção dos primeiros plasmídeos replicativos artificiais para estas espécies. Com exceção dos plasmídeos instáveis descritos anteriormente em *M. capricolum* e *M. mycoïdes* subsp. *mycoïdes* (KING e DYBVIG, 1992), nenhum outro vetor é conhecido por se replicar nas espécies do gênero *Mycoplasma*. Além disso, *M. pulmonis*, *M. capricolum* e *S. citri* são os únicos mollicutes nos quais plasmídeos *oriC* são capazes de se replicar. Entretanto, existe a possibilidade de que esta estratégia possa ser aplicada em outros membros desta classe de bactérias para os quais ferramentas genéticas são bastante escassas (DYBVIG & VOELKER, 1996).

A não transformação de *M. pulmonis* com plasmídeos *oriC* de *S. citri* indica que fatores específicos em relação ao hospedeiro regulam a replicação destes plasmídeos. Estes resultados não eram totalmente inesperados por terem sido descritos em outros gêneros bacterianos. De fato, plasmídeos *oriC* de *Mycobacterium tuberculosis* não se replicam em micobactérias de crescimento rápido como *M. smegmatis* (QIN et al., 1999). Do mesmo modo, plasmídeos *oriC* de *M. smegmatis* não se replicam em micobactérias de crescimento lento como *M. tuberculosis*. Entretanto, existe a possibilidade de que esta barreira de especificidade possa ser vencida no caso de espécies de mollicutes que são filogeneticamente mais próximos. De fato, neste trabalho, foi possível demonstrar que plasmídeos contendo a região *oriC* de *M. capricolum* são capazes de se replicar também em *M. mycoïdes* subsp. *mycoïdes* LC. No momento, estão em andamento estudos para a expressão heteróloga de genes nestas duas espécies de micoplasmas, utilizando estes plasmídeos replicativos artificiais. Estes trabalhos podem ter grandes implicações no desenvolvimento de vacinas, principalmente

contra a Pleuropneumonia Contagiosa Caprina, causada por *M. mycoides* subsp. *capricolum*, e a Pleuropneumonia Contagiosa Bovina, causada por *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC.

Por outro lado, a falha na transformação de *M. genitalium* com os plasmídeos PMGO1 e pMGO2 não era esperada, apesar da análise inicial dos dados do sequenciamento de seu genoma não ter determinado a região *oriC* deste micoplasma (FRASER et al., 1995). Este fato foi devido à característica não usual da organização dos genes normalmente encontrados nesta região, em comparação com *B. subtilis* e outras bactérias, inclusive mollicutes como *S. citri*, *M. capricolum* e *M. pulmonis*. Um estudo posterior localizou a região *oriC* no fragmento intergênico *spoJ-dnaA* de *M. genitalium* (LOBRY, 1996). Entretanto, a *oriC* deste micoplasma não foi experimentalmente caracterizada até o momento. Com os resultados de nossos experimentos, a exata localização desta região no cromossomo de *M. genitalium* permanece desconhecida.

Poder-se-ia pensar que a falha destes plasmídeos em replicar nas células de *M. genitalium* fosse devida a uma falta de reconhecimento do promotor ligado ao *tetM*, que é proveniente de *S. citri*, um mollicute patógeno de plantas. Entretanto, este promotor mostrou-se viável na transformação de *M. pulmonis* e outras espécies do gênero *Mycoplasma*. Portanto, esta falha na replicação provavelmente é devido ao não reconhecimento, pelo micoplasma, de uma possível SRA presente nos vetores. É possível que esta falha na transformação de *M. genitalium* seja devida a uma restrição quanto a cepa de micoplasma utilizada. Esta é uma característica comum de outras bactérias atípicas, como *S. citri* (RENAUDIN, comunicação pessoal), e *Xylella fastidiosa* (MONTEIRO et al., 2001), onde muitas vezes a cepa tipo da espécie não é a mais adequada para experimentos de transformação *in vitro*.

Analisando o comportamento destes plasmídeos artificiais pela

avaliação da integração ou não do plasmídeo pMPO1 no cromossomo de *M. pulmonis*, verificamos que este vetor sofre integração logo a partir da segunda passagem após a transformação. Este fato tem duas principais implicações: por um lado, demonstra que o fenômeno de recombinação homóloga, utilizando plasmídeos artificiais, pode ocorrer em *M. pulmonis*, o que possibilita a utilização desta estratégia para a dirupção de genes de interesse.

Logo após a transformação, as colônias tet^R selecionadas em meio sólido apresentam um crescimento marcadamente mais lento, com um tamanho reduzido em comparação com as colônias de micoplasma não transformado. Porém, logo após a segunda passagem em meio líquido, as culturas transformadas começam a crescer rapidamente, diminuindo significativamente seu tempo de geração em comparação com as culturas não transformadas. Este fato também é observado com o mollicute *S. citri*, e parece coincidir com o momento da integração do plasmídeo replicativo no cromossomo do microrganismo (RENAUDIN, comunicação pessoal). É possível que essa aceleração do crescimento possa ser devido a um aumento da expressão da proteína DnaA, que inicia a replicação do DNA, agora em duas cópias no cromossomo.

Entretanto, pelo fato da integração do plasmídeo pMPO1 na região *oriC* de *M. pulmonis* acontecer de maneira tão rápida, sua utilização nos estudos funcionais do genoma é limitada. Esta característica pode dificultar a integração de um vetor de dirupção no gene alvo, principalmente se o tamanho do fragmento clonado for menor que a região *oriC* presente no plasmídeo.

Por esta razão, foram realizados experimentos com o objetivo de reduzir o tamanho do fragmento da região *oriC* responsável pela atividade de SRA em *M. pulmonis*. Desta forma, esperava-se diminuir ou até mesmo eliminar a integração do plasmídeo replicativo artificial na região *oriC* do cromossomo do micoplasma. Estes experimentos indicaram que ambas as regiões intergênicas localizadas a 3' e a 5' do gene *dnaA* foram necessárias para a replicação dos plasmídeos. Este fato, incomum entre as bactérias Gram-positivas, também ocorre em *B. subtilis* (MORIYA et al., 1992). Nesta bactéria, inclusive, foi sugerido que a

configuração tridimensional da fita dupla de DNA estaria envolvida no início da replicação (MORIYA et al., 1994). Esta hipótese é reforçada pelos resultados obtidos em nosso trabalho, demonstrando que a inserção das regiões intêrgenicas localizadas nas extremidades 3' e 5' do gene *dnaA* no vetor pSRT2 não resulta em um plasmídeo replicativo (pMPO4), a não ser que estes dois fragmentos estejam espaçados, tanto pelo gene *dnaA* (pMPO1) ou pelo gene *tetM* (pMPO5). Em *S. citri* (RENAUDIN et al., 1995) e em várias bactérias Gram-positivas, incluindo *Streptomyces spp.* (ZAKRZEWSKA-CZERWINSKA e SCHREMPF, 1992), *Mycobacterium smegmatis*, *M. bovis*, *M. tuberculosis* e *M. avium* (MADIRAJU et al., 1999), somente a região de DnaA boxes localizada a 3' do gene *dnaA* mostrou-se suficiente para a replicação dos plasmídeos. Por outro lado, a região localizada a 5' do gene *dnaA* é responsável pela replicação dos plasmídeos em *Pseudomonas putida* e *P. aeruginosa* (YEE & SMITH, 1990). Entretanto, não é possível determinar com exatidão os fatores necessários para a função da *oriC* cromossômica através da análise da *oriC* clonada, pelo fato desta região apresentar comportamento diferente quando inserida em plasmídeos, os chamados mini-cromossomos (ASAI et al., 1998).

Ao contrário do plasmídeo pMPO1, que sofre integração no cromossomo de *M. pulmonis* após poucas passagens *in vitro*, o plasmídeo pMOP5 permaneceu livre na célula do micoplasma por ao menos 15 passagens. Assim, este é o primeiro plasmídeo artificial capaz de funcionar como vetor de transferência de genes entre *E. coli* e *M. pulmonis*. Curiosamente, as culturas de *M. pulmonis* mantém a característica de crescimento lento após a transformação com o plasmídeo pMPO5 ao longo das passagens em meio líquido. Elas não apresentam uma aceleração do crescimento, corroborando a observação de que esta alteração do tempo de geração das células dos mollicutes coincide com a integração do plasmídeo replicativo no cromossomo.

Deste modo, foi avaliado o potencial da utilização deste vetor para a inativação específica de genes por recombinação homóloga. O gene *hlyA* foi escolhido por ter sido sugerido como tendo um papel importante na patogenicidade, e por ser, ao menos *in vitro*, um gene não essencial (HYATT et al., 1994). Este gene pertence a uma família de hemolisinas, composta principalmente pelas hemolisinas HlyA, HlyB, HlyC e HlyD (STANLEY et al., 1998). Em *E. coli*, a hemolisina A é uma toxina formadora de poros nas células dos hospedeiro. Entretanto, para ser funcional, a hemolisina HlyA deve ser acilada pela hlyC. A proteína hlyB é uma ATPase de membrana, que faz com que a hlyA seja secretada pela bactéria, com o auxílio da proteína de membrana HlyD (STANLEY et al., 1998). No genoma de *M. pulmonis* foram encontrados somente os genes *hlyA* e *hlyC* (CHAMBAUD et al., 2001). Desta forma, a hemolisina A do micoplasma aparentemente manteve durante a evolução a necessidade da acilação para sua ativação. Por outro lado, a possibilidade da hemolisina permanecer confinada ao citoplasma ou exposta na membrana do microrganismo, ou até ser secretada por outros mecanismos deve ainda ser investigada. Embora seu mecanismo de patogenicidade também deva ser melhor estudado, pode-se supor que a lise dos eritrócitos possa servir como uma fonte de ferro para a bactéria, e a lise de leucócitos pode ser um mecanismo de evasão da fagocitose. Com o desenvolvimento de sistemas de transformação e estudo funcional de genes de *M. pulmonis*, estes mecanismos e a eventual importância da hemolisina A na patogenicidade do micoplasma serão eventualmente elucidados.

Para obter a inativação do gene *hlyA* de *M. pulmonis*, neste trabalho foi escolhida a estratégia de inserção do vetor de interrupção com um único *crossing-over*, através da amplificação de um fragmento interno do gene alvo e clonagem nos plasmídeos replicativos artificiais. Esta abordagem foi escolhida em detrimento da substituição do gene alvo por um marcador de seleção, por exemplo, pela maior probabilidade da ocorrência de um simples evento de recombinação homóloga entre o cromossomo e o vetor, em comparação com dois eventos simultâneos necessários para a substituição do gene alvo. No presente trabalho, pudemos observar a integração dos vetores de interrupção no gene *hlyA* de *M. pulmonis*, através do aparecimento de fragmentos de DNA de tamanhos diferentes

que hibridam com uma sonda *hlyA*, em comparação com os fragmentos de DNA do micoplasma não transformado. O aparecimento destes fragmentos é bastante claro nas culturas de *M. pulmonis* transformadas com o vetor pMPO5- $\Delta hlyA$ que foram submetidas a diferentes passagens sem pressão seletiva, e em seguida isoladas novamente em meio contendo tetraciclina. A integração dos vetores de dirupção no gene alvo foi também claramente identificada pela PCR, utilizando um *primer* que reconhece uma sequência no cromossomo e outro que reconhece uma sequência no vetor.

Apesar de eventos de dirupção do gene terem sido detectados mais facilmente em culturas de *M. pulmonis* transformadas com o vetor pMPO5- $\Delta hlyA$, não foi possível obter um mutante *hlyA*⁽⁻⁾. A agregação das células do micoplasma não permitiu o isolamento de uma cultura mutante pura, apesar de terem sido realizadas seis etapas de isolamento por filtração. Aparentemente, pelo pequeno tamanho do fragmento do gene alvo clonado nos vetores de dirupção, a frequência de dirupção foi muito baixa. Este fato pode também ser devido a um efeito polar à dirupção do gene, causando a inativação de genes essenciais. Entretanto, tentativas similares para a dirupção de outros genes sugerem que outros mecanismos dificultem esta integração (BLANCHARD, comunicação pessoal). Para superar esses raros eventos de integração, estratégias de contra-seleção da replicação destes plasmídeos *oriC* podem se tornar eficazes, como sugerido para outras bactérias (REYRAT et al., 1998), além da substituição do gene alvo com uma estratégia de *crossing-over* duplo, utilizando um segundo marcador de seleção. Alternativamente, a inativação do gene *hlyC* pode também ser realizada para a avaliação de sua eventual participação na acilação da hemolisina A. Ao menos em *E. coli*, nenhum dos efeitos da HlyA em células eucarióticas pode ser observado na ausência da proteína auxiliar, HlyC (STANLEY et al., 1998).

Apesar da dirupção do gene da hemolisina A de *M. pulmonis* ter sido demonstrada por PCR e Southern blotting, o teste de atividade hemolítica em

tubos aparentemente não apresentou sensibilidade suficiente para detectar a pequena população que apresenta o gene mutado nas culturas. Por outro lado, o teste pareceu confiável em discriminar micoplasmas hemolíticos e não hemolíticos, pois não foi possível detectar nenhuma atividade analisando culturas de *M. penetrans*, utilizado aqui como controle negativo, por não ter apresentado este tipo de atividade hemolítica de membrana em estudos anteriores (MINION & JARVILL-TAYLOR, 1994). Entretanto, atividade hemolítica média de *M. pulmonis* obtida em nossos experimentos ($5,0 \pm 0,89$), foi menor do que a encontrada pelos autores que desenvolveram o procedimento ($28,7 \pm 12,0$), o que pode ser devido a diferenças de reagentes utilizados e condições de laboratório.

Em breve, esperamos obter o aprimoramento destes primeiros plasmídeos replicativos artificiais capazes de transformar *M. pulmonis*, e o desenvolvimento de novas estratégias para a obtenção de uma cultura pura de *M. pulmonis* com o gene da hemolisina A mutado. Assim, esperamos poder avaliar a atividade biológica e o papel do produto deste gene na patogenicidade do micoplasma, reproduzindo a Micoplasmose Respiratória Murina por infecção experimental em camundongos.

CONCLUSÕES

- Neste trabalho, foi possível caracterizar experimentalmente as origens de replicação cromossômica (*oriC*) de *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* e de *M. pulmonis* como estando localizadas na região que contém os DnaA boxes em torno do gene *dnaA*. Por outro lado, a *oriC* de *M. genitalium* permanece não caracterizada, por não ter sido possível construir plasmídeos replicativos com a clonagem das regiões que contém os possíveis DnaA boxes deste micoplasma.
- Os novos plasmídeos artificiais construídos mostraram-se capazes de transformar as células de *M. capricolum* subsp. *capricolum* e de *M. pulmonis* com uma frequência bastante satisfatória.
- Verificamos que os plasmídeos contendo a região *oriC* de *M. capricolum* subsp. *capricolum* são capazes de transformar a espécie filogeneticamente relacionada *M. mycoïdes* subsp. *mycoïdes* variedade LC.
- Por outro lado, plasmídeos contendo a *oriC* do mollicute *Spiroplasma citri* não são capazes de transformar *M. pulmonis*, sugerindo a presença de barreiras para a atividade da *oriC* em diferentes espécies de microrganismos.
- Neste trabalho demonstramos que a recombinação homóloga é um evento passível de ocorrer em *M. pulmonis*, pela observação da rápida integração do plasmídeo pMPO1 no cromossomo do micoplasma.
- Verificamos também que o plasmídeo pMPO5, que contém a região *oriC* reduzida, não sofre integração no cromossomo de *M. pulmonis* ao menos

até a 15^o passagem, e também não é mantido pela célula do micoplasma na ausência de pressão seletiva.

- Demonstramos que estes novos plasmídeos replicativos artificiais são capazes de sofrer integração em um gene específico de *M. pulmonis*, podendo se tornar ferramentas genéticas importantes nos estudos funcionais do genoma deste microrganismo. Entretanto, não foi possível obter uma cultura pura de *M. pulmonis* com o gene da hemolisina A inativado, o que torna necessário o aprimoramento deste sistema de mutação dirigida por recombinação homóloga.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ¹

- AMIKAM, D., GLASER, G., RAZIN, S. Mycoplasmas (Mollicutes) have a low number of rRNA genes. **J. Bacteriol.**, Washington, v.158, n.1, p.376-378, 1984.
- ARTIUSHIN, S., DUVALL, M., MINION, F.C. Phylogenetic analysis of mycoplasma strain ISM1499 and its assignment to the *Acholeplasma oculi* strain cluster. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Washington, v.45, n.1, p.104-109, 1995.
- ASAI, T., BATES, D.B., BOYE, E., KOGOMA, T. Are minichromosomes valid model systems for DNA replication control? Lessons learned from *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v.29, n.3, p.671-675, 1998.
- BAILEY, C.C., YOUNKINS, R., HUANG, W.M., BOTT, K.F. Characterization of genes encoding topoisomerase IV of *Mycoplasma genitalium*. **Gene**, Amsterdam, v.168, n.1, p.77-80, 1996.
- BAILEY, T., ELKAN, C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON INTELLIGENT SYSTEMS FOR MOLECULAR BIOLOGY, 2, Menlo Park, 1994. **Proceedings**. Menlo Park: AAAI Press, 1994.
- BARBEYRAC, B., BEBEAR, C., TAYLOR-ROBINSON, J.G. PCR: preparation of DNA from clinical specimens. In: RAZIN, S., TULLY, J.G., eds. **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**. San Diego: Academic Press, 1996. v.2, p.61-64. (Diagnostic procedures).

¹ De acordo com a NBR 6023/2000 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1997[Cd-rom].

- BARROSO, G., LABARERE, J. Chromosomal gene transfer in *Spiroplasma citri*. **Science**, Washington, v.241, n.4868, p.959-961, 1988.
- BARROSO, G., SALVADO, J.-C., LABARERE, J. Influence of genetic markers and the fusing agent polyethylene glycol on chromosomal transfer in *Spiroplasma citri*. **Curr. Microbiol.**, Secaucus, v.20, p.53-56, 1990.
- BARRY, M.A., LAI, W.C., JOHNSTON, S.A. Protection against mycoplasma infection using expression-library immunization. **Nature**, London, v.377, n.6550, p.632-635, 1995.
- BEHBAHANI, N., BLANCHARD, A., CASSELL, G.H., MONTAGNIER, L. Phylogenetic analysis of *Mycoplasma penetrans*, isolated from HIV-infected patients. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v.109, n.1, p.63-66., 1993.
- BERGEMANN, A.D., WHITLEY, J.C., FINCH, L.R. Homology of mycoplasma plasmid pADB201 and staphylococcal plasmid pE194. **J. Bacteriol.**, Washington, v.171, n.1, p.593-595, 1989.
- BHUGRA, B., DYBVIG, K. Identification and characterization of IS1138, a transposable element from *Mycoplasma pulmonis* that belongs to the IS3 family. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v.7, n.4, p.577-584, 1993.
- BHUGRA, B., VOELKER, L.L., ZOU, N., YU, H., DYBVIG, K. Mechanism of antigenic variation in *Mycoplasma pulmonis*: interwoven, site-specific DNA inversions. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v.18, n.4, p.703-714, 1995.
- BIRNBOIM, H.C., DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v.7, p.1513-1523, 1979.
- BLANCHARD, A. *Ureaplasma urealyticum* urease genes; use of a UGA tryptophan codon. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v.4, n.4, p.669-676, 1990.
- BLANCHARD, A., CRABB, D.M., DYBVIG, K., DUFFY, L.B., CASSELL, G.H. Rapid detection of *tetM* in *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* by PCR:

tetM confers resistance to tetracycline but not necessarily to doxycycline.

FEMS Microbiol. Lett., Amsterdam, v.74, n.2/3, p.277-281, 1992.

BORK, P., OUZOUNIS, C., CASARI, G., SCHNEIDER, R., SANDER, C., DOLAN, M., GILBERT, W., GILLEMET, P.M. Exploring the *Mycoplasma capricolum* genome: a minimal cell reveals its physiology. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v.16, n.5, p.955-967, 1995.

BOVE, J.M. Molecular features of mollicutes. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.17, suppl.1, p.S10-S31, 1993.

BROWN, M.B., STEINER, D.A. Experimental genital mycoplasmosis: time of infection influences pregnancy outcome. **Infect. Immun.**, Washington, v.64, n.6, p.2315-2321, 1996.

CAO, J., KAPKE, P.A., MINION, F.C. Transformation of *Mycoplasma gallisepticum* with *Tn916*, *Tn4001*, and integrative plasmid vectors. **J. Bacteriol.**, Washington, v.176, n.14, p.4459-4462, 1994.

CASELL, G.H. Derrick Edward Award Lecture. The pathogenic potential of mycoplasmas: *Mycoplasma pulmonis* as a model. **Rev. Infect. Dis.**, Chicago, v.4, suppl., p.S18-S34, 1982.

CHAMBAUD, I. Séquençage et analyse du génome de *Mycoplasma pulmonis*, l'agent étiologique de la Mycoplasmosse Respiratoire Murine. Rennes, 2000. 271p. (Tese de Doutorado - École Nationale Supérieure Agronomique de Rennes - Université de Rennes).

CHAMBAUD, I., HEILIG, R., FERRIS, S., BARBE, V., SAMSON, D., GALISSON, F., MOSZER, I., DYBVIG, K., WROBLEWSKI, H., VIARI, A., ROCHA, E.P., BLANCHARD, A. The complete genome sequence of the murine respiratory pathogen *Mycoplasma pulmonis*. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v.29, n.10, p.2145-2153, 2001.

CORDOVA, C.M.M., BLANCHARD, A., CUNHA, R.A.F. Higher prevalence of urogenital mycoplasmas in human immunodeficiency virus-positive patients as

- compared to patients with other sexually transmitted diseases. **J. Clin. Lab. Anal.**, New York, v.14, n.5, p.246-253, 2000.
- CORDOVA, C.M.M., CUNHA, R.A.F. Relevant prevalence of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* serogroups in HIV-1 infected men without urethritis symptoms. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, São Paulo, v.42, n.4, p.185-188, 2000.
- CORDOVA, C.M.M., CUNHA, R.A.F. Detecção de *Mycoplasma genitalium*, *M. fermentans* e *M. penetrans* em pacientes com sintomas de uretrite e em indivíduos infectados pelo HIV-1 no Brasil. **J. Bras. Patol.**, Rio de Janeiro, v.38, n.1, p.119-126, 2002.
- CORDOVA, C.M.M., TAKEI, K., ROSENTHAL, C., MIRANDA, M.A., VAZ, A.J., CUNHA, R.A.F. Evaluation of IgG, IgM, and IgA antibodies to *Mycoplasma penetrans* detected by ELISA and immunoblot in HIV-1-infected and STD patients, in Sao Paulo, Brazil. **Microbes Infect.**, Paris, v.1, n.13, p.1095-1101, 1999.
- COX, N.R., DAVIDSON, M.K., DAVIS, J.K., LINDSEY, J.R., CASSELL, G.H. Natural mycoplasmal infections in isolator-maintained LEW/Tru rats. **Lab. Anim. Sci.**, Cordova, v.38, n.4, p.381-388, 1988.
- D'ALENCON, E., PETRANOVIC, M., MICHEL, B., NOIROT, P., AUCOUTURIER, A. Copy-choice illegitimate recombination revisited. **EMBO J.**, Oxford, v.13, p.2725-2734, 1994.
- DE BARBEYRAC, B., DUPON, M., RODRIGUEZ, R., RENAUDIN, H., BEBEAR, C. A Tn1545-like transposon carries the *tet(M)* gene in tetracycline resistant strains of *Bacterioides ureolyticus* as well as *Ureaplasma urealyticum*, but not *Neisseria gonorrhoeae*. **J. Antimicrob. Chemother.**, Oxford, v.37, p.223-232, 1996.
- DHANDAYUTHAPANI, S., RASMUSSEN, W.G., BASEMAN, J.B. Disruption of gene mg218 of *Mycoplasma genitalium* through homologous recombination

- leads to an adherence-deficient phenotype. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v.96, n.9, p.5227-5232, 1999.
- DURET, S., DANET, J.L., GARNIER, M., RENAUDIN, J. Gene disruption through homologous recombination in *Spiroplasma citri*: an scm1-disrupted motility mutant is pathogenic. **J. Bacteriol.**, Washington, v.181, n.24, p.7449-7456, 1999.
- DYBVIG, K. Transformation of *Acholeplasma laidlawii* with streptococcal plasmids pVA868 and pVA920. **Plasmid**, Orlando, v.21, n.2, p.155-160, 1989.
- DYBVIG, K. The genetics and basic biology of *Mycoplasma pulmonis*: how much is actually *Acholeplasma*? **Plasmid**, Orlando, v.30, n.2, p.176-178, 1993.
- DYBVIG, K., ALDERETE, J. Transformation of *Mycoplasma pulmonis* and *Mycoplasma hyorhinis*: transposition of Tn916 and formation of cointegrate structures. **Plasmid**, Orlando, v.20, n.1, p.33-41, 1988.
- DYBVIG, K., CASSELL, G.H. Transposition of gram-positive transposon Tn916 in *Acholeplasma laidlawii* and *Mycoplasma pulmonis*. **Science**, Washington, v.235, n.4794, p.1392-1394, 1987.
- DYBVIG, K., FRENCH, C.T., VOELKER, L.L. Construction and use of derivatives of transposon Tn4001 that function in *Mycoplasma pulmonis* and *Mycoplasma arthritidis*. **J. Bacteriol.**, Washington, v.182, n.15, p.4343-4347, 2000.
- DYBVIG, K., GASPARICH, E., KING, K.W. Artificial transformation of *Mollicutes* via polyethylene glycol- and electroporation- mediated methods. In: RAZIN, S., TULLY, J.G., eds. **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**. San Diego: Academic Press, 1996. v.1, p.179-184. (Molecular characterization).
- DYBVIG, K., MANILOFF, J. Integration and lysogeny by an enveloped mycoplasma virus. **J. Gen. Virol.**, v.64, pt.8, p.1781-1785, 1983.

- DYBVIG, K., VOELKER, L.L. Molecular biology of mycoplasmas. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v.50, p.25-57, 1996.
- DYBVIG, K., YU, H. Regulation of a restriction and modification system via DNA inversion in *Mycoplasma pulmonis*. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v.12, n.4, p.547-560, 1994.
- ERLICH, S.D., BIERNE, H., D'ALENCON, E., VILETTE, D., PETRANOVIC, M. Mechanisms of illegitimate recombination. **Gene**, Amsterdam, v.135, p.161-166, 1993.
- EVENGARD, B., SANDSTEDT, K., BOLSKE, G., FEINSTEIN, R., RIESENFELT-ORN, I., SMITH, C.I. Intranasal inoculation of *Mycoplasma pulmonis* in mice with severe combined immunodeficiency (SCID) causes a wasting disease with grave arthritis. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v.98, n.3, p.388-394, 1994.
- FAULKNER, C.B., SIMECKA, J.W., DAVIDSON, M.K., DAVIS, J.K., SCHOEB, T.R., LINDSEY, J.R., EVERSON, M.P. Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, interleukin 6, and gamma interferon in C3H/HeN and C57BL/6N mice in acute *Mycoplasma pulmonis* disease. **Infect. Immun.**, Washington, v.63, n.10, p.4084-4090, 1995.
- FISSEHA, M., GOHLMANN, H.W., HERRMANN, R., KRAUSE, D.C. Identification and complementation of frameshift mutations associated with loss of cytoadherence in *Mycoplasma pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, Washington, v.181, n.14, p.4404-4410, 1999.
- FOISSAC, X., SAILLARD, C., BOVE, J.M. Random insertion of transposon Tn4001 in the genome of *Spiroplasma citri* strain GII3. **Plasmid**, Orlando, v.37, n.1, p.80-86, 1997.
- FRASER, C.M., GOCAYNE, J.D., WHITE, O., ADAMS, M.D., CLAYTON, R.A., FLEISCHMANN, R.D., BULT, C.J., KERLAVAGE, A.R., SUTTON, G., KELLEY, J.M. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. **Science**, Washington, v.270, n.5235, p.397-403, 1995.

- FREUND, E.A. Culture media for classic mycoplasmas. In: RAZIN, S., TULLY, G., eds. **Methods in mycoplasmaology**. San Diego: Academic Press, 1983. v.1, p.127.
- FREY, J., CHENG, X., KUHNERT, P., NICOLET, J. Identification and characterization of IS1296 in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC and presence in related mycoplasmas. **Gene**, Amsterdam, v.160, n.1, p.95-100, 1995.
- FREY, J., NICOLET, J. Molecular identification and epidemiology of animal mycoplasmas. **Wien Klin. Wochenschr.**, Wien, v.109, n.14-15, p.600-603, 1997.
- FUJITA, M.Q., YOSHIKAWA, H., OGASAWARA, N. Structure of the dnaA and DnaA-box region in the *Mycoplasma capricolum* chromosome: conservation and variations in the course of evolution. **Gene**, Amsterdam, v.110, n.1, p.17-23, 1992.
- GAURIVAUD, P., LAIGRET, F., GARNIER, M., BOVE, J.M. Fructose utilization and pathogenicity of *Spiroplasma citri*: characterization of the fructose operon. **Gene**, Amsterdam, v.252, n.1/2, p.61-69, 2000.
- GLASS, J.I., LEFKOWITZ, E.J., GLASS, J.S., HEINER, C.R., CHEN, E.Y., CASSELL, G.H. The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. **Nature**, London, v.407, n.6805, p.757-762, 2000.
- HALDENWANG, W. G. The sigma factor of *Bacillus subtilis*. **Microbiol. Rev.**, Washington, v.59, p.1-30, 1995.
- HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol.**, Sidcup, v.166, n.4, p.557-580, 1983.
- HEDREYDA, C.T., LEE, K.K., KRAUSE, D.C. Transformation of *Mycoplasma pneumoniae* with Tn4001 by electroporation. **Plasmid**, Orlando, v.30, n.2, p.170-175, 1993.

- HEIJNE, V. The signal peptide. **J. Membr. Biol.**, New York, v.115, p.195-201, 1990.
- HILBERT, H., HIMMELREICH, R., PLAGENS, H., HERRMANN, R. Sequence analysis of 56 kb from the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae* comprising the dnaA region, the atp operon and a cluster of ribosomal protein genes. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v.24, n.4, p.628-639, 1996.
- HIMMELREICH, R., HILBERT, H., PLAGENS, H., PIRKL, E., LI, B.C., HERRMANN, R. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v.24, n.22, p.4420-4449, 1996.
- HU, W.S., WANG, R.Y., LIOU, R.S., SHIH, J.W., LO, S.C. Identification of an insertion-sequence-like genetic element in the newly recognized human pathogen *Mycoplasma incognitus*. **Gene**, Amsterdam, v.93, n.1, p.67-72, 1990.
- HUTCHISON, C.A., PETERSON, S.N., GILL, S.R., CLINE, R.T., WHITE, O., FRASER, C.M., SMITH, H.O., VENTER, J.C. Global transposon mutagenesis and a minimal Mycoplasma genome. **Science**, Washington, v.286, n.5447, p.2165-2169, 1999.
- HYATT, D.R., TER HUURNE, A.A.H.M., VAN DER ZEIJST, B.A.M., JOENS, L.A. Reduced virulence of *Serpulina hyodysenteriae* hemolysin-negative mutants in pigs and their potential to protect pigs against challenge with a virulent strain. **Infect. Immun.**, Washington, v.62, p.2244-2248, 1994.
- JACOB, C., NOUZIERES, F., DURET, S., BOVE, J.M., RENAUDIN, J. Isolation, characterization, and complementation of a motility mutant of *Spiroplasma citri*. **J. Bacteriol.**, Washington, v.179, n.15, p.4802-4810, 1997.
- JARVILL-TAYLOR, K.J., MINION, F.C. The effect of thiol-active compounds and sterols on the membrane-associated hemolysin of *Mycoplasma pulmonis*. **FEMS Microbiol Lett.**, Amsterdam, v.128, n.2, p.213-218, 1995.

- JENSEN, J.S., HANSEN, H.T., LIND, K. Isolation of *Mycoplasma genitalium* strains from the male urethra. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.34, n.2, p.286-291, 1996.
- KAMIYAMA, T., SAITO, M., NAKAGAWA, M. Effects of *Mycoplasma pulmonis* infection and exposure to nitrogen dioxide on activities of natural killer cells and macrophages of the mouse. **Jikken Dobutsu**, Tokyo, v.40, n.2, p.255-257, 1991.
- KAPKE, P.A., KNUDTSON, K.L., MINION, F.C. Transformation of Mollicutes with single-stranded Tn4001 DNA. **Plasmid**, Orlando, v.32, n.1, p.85-88, 1994.
- KING, K.W., DYBVIG, K. Plasmid transformation of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* is promoted by high concentrations of polyethylene glycol. **Plasmid**, Orlando, v.26, n.2, p.108-115, 1991.
- KING, K.W., DYBVIG, K. Nucleotide sequence of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* plasmid pKMk1. **Plasmid**, Orlando, v.28, n.1, p.86-91, 1992.
- KING, K. W.; DYBVIG, K. Mycoplasmal cloning vectors derived from plasmid pKMk1. **Plasmid**, Orlando, v.31, p.49-59, 1993.
- KING, K.W., DYBVIG, K. Transformation of *Mycoplasma capricolum* and examination of DNA restriction modification in *M. capricolum* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. **Plasmid**, Orlando, v.31, n.3, p.308-311, 1994.
- KONG, F., JAMES, G., MA, Z., GORDON, S., BIN, W., GILBERT, G.L. Phylogenetic analysis of *Ureaplasma urealyticum*--support for the establishment of a new species, *Ureaplasma parvum*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Washington, v.49, pt.4, p.1879-1889, 1999.
- KRAUSE, D.C., BALISH, M.F. Structure, function, and assembly of the terminal organelle of *Mycoplasma pneumoniae*. **FEMS Microbiol Lett.**, Amsterdam, v.198, n.1, p.1-7, 2001.

- LADEFOGED, S.A., CHRISTIANSEN, G. Sequencing analysis reveals a unique gene organization in the *gyrB* region of *Mycoplasma hominis*. **J. Bacteriol.**, Washington, v.176, n.18, p.5835-5842, 1994.
- LAI, W.C., BENNETT, M., PAKES, S.P., MURPHREE, S.S. Potential subunit vaccine against *Mycoplasma pulmonis* purified by a protective monoclonal antibody. **Vaccine**, Oxford, v.9, n.3, p.177-84, 1991.
- LAI, W.C., PAKES, S.P., REN, K., LU, Y.S., BENNETT, M. Therapeutic effect of DNA immunization of genetically susceptible mice infected with virulent *Mycoplasma pulmonis*. **J. Immunol.**, Bethesda, v.158, n.6, p.2513-2516, 1997.
- LAMBERT, L.C., TRUMMELL, H.Q., SINGH, A., CASSELL, G.H., BRIDGES, R.J. *Mycoplasma pulmonis* inhibits electrogenic ion transport across murine tracheal epithelial cell monolayers. **Infect. Immun.**, Washington, v.66, n.1, p.272-279, 1998.
- LEVINSON, G., GUTMAN, G.A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Mol. Biol. Evol.**, Lawrence, v.4, p.203-221, 1987.
- LIND, K., KRISTENSEN, G.B. Significance of antibodies to *Mycoplasma genitalium* in salpingitis. **Eur. J. Clin. Microbiol.**, Wiesbaden, v.6, n.2, p.205-207, 1987.
- LLOYD, R.G., LOW, K.B. Homologous recombination. In: NEIDHARDT, F.C., CURTISS III, R., INGRAHAM, J.L., LIN, E.C.C., LOW, K.B., MAGASANIK, B., REZNIKOFF, W.S., RILEY, M., SCHAECHTER, M., UMBARGER, H.E., eds. ***Escherichia coli* and *Salmonella***: cellular and molecular biology. 2.ed. Washington: ASM Press, 1996. v.2, p.2236-2255.
- LOBRY, J.R. Origin of replication of *Mycoplasma genitalium*. **Science**, Washington, v.272, n.5262, p.745-746, 1996.
- LORENZ, A., JUST, W., da SILVA CARDOSO, M., KLOTZ, G. Electroporation-mediated transfection of *Acholeplasma laidlawii* with mycoplasma virus L1 and L3 DNA. **J. Virol.**, Washington, v.62, n.8, p.3050-3052, 1988.

- LUCIER, T.S., HU, P.Q., PETERSON, S.N., SONG, X.Y., MILLER, L., HEITZMAN, K., BOTT, K.F., HUTCHISON THIRD, C.A., HU, P.C. Construction of an ordered genomic library of *Mycoplasma genitalium*. **Gene**, Amsterdam, v.150, n.1, p.27-34, 1994.
- MACAO, B., LUIRINK, J., SAMUELSSON, T. Ffh and FtsY in a *Mycoplasma mycoides* signal-recognition particle pathway: SRP RNA and M domain of Ffh are not required for stimulation of GTPase activity *in vitro*. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v.24, n.3, p.523-534, 1997.
- MADIRAJU, M.V., QIN, M.H., YAMAMOTO, K., ATKINSON, M.A., RAJAGOPALAN, M. The *dnaA* gene region of *Mycobacterium avium* and the autonomous replication activities of its 5' and 3' flanking regions. **Microbiology**, Reading, v.145, pt.10, p.2913-2921, 1999.
- MAHAIRAS, G.G., MINION, F.C. Transformation of *Mycoplasma pulmonis*: demonstration of homologous recombination, introduction of cloned genes, and preliminary description of an integrating shuttle system. **J. Bacteriol.**, Washington, v.171, n.4, p.1775-1780, 1989.
- MANILOFF, J. Mycoplasma viruses. In: MANILOFF, J., MCELHANEY, R.N., FINCH, L.R., BASEMAN, J.B., eds. **Mycoplasmas**: molecular biology and pathogenesis. Washington: ASM Press, 1992. v.1, p.41-59.
- MANILOFF, J. Phylogeny of mycoplasmas. In: MANILOFF, J., MCELHANEY, R.N., FINCH, L.R., BASEMAN, J.B., eds. **Mycoplasmas**: molecular biology and pathogenesis. Washington: ASM Press, 1992. v.1, p.549-559.
- MANILOFF, J. The minimal cell genome: "on being the right size". **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v.93, n.19, p.10004-10006, 1996.
- MARMUR, J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. **J. Mol. Biol.**, Sidcup, v.3, p.208-218, 1961.
- McDONALD, D.M., SCHOEB, T.R., LINDSEY, J.R. *Mycoplasma pulmonis* infections cause long-lasting potentiation of neurogenic inflammation in the

- respiratory tract of the rat. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v.87, n.3, p.787-799, 1991.
- MENG, K.E., PFISTER, R.M. Intracellular structures of *Mycoplasma pneumoniae* revealed after membrane removal. **J. Bacteriol.**, Washington, v.144, n.1, p.390-399, 1980.
- MESSER, W., WEIGEL, C. Initiation of chromosome replication. In: NEIDHARDT, F.C., CURTISS III, R., INGRAHAM, J.L., LIN, E.C.C., LOW, K.B., MAGASANIK, B., REZNIKOFF, W.S., RILEY, M., SCHAECHTER, M., UMBARGER, H.E., eds. ***Escherichia coli* and *Salmonella***: cellular and molecular biology. 2.ed. Washington: ASM Press, 1996. v.2, p.1579-1601.
- MILER, R.V., KOKJOHN, T.A. General microbiology of *recA*: environmental and evolutionary significance. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v.44, p.365-394, 1990.
- MILES, R.J. Catabolism in mollicutes. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v.138, pt.9, p.1773-1783, 1992.
- MINION, F.C., JARVILL-TAYLOR, K. Membrane-associated hemolysin activities in mycoplasmas. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v.116, n.1, p.101-106, 1994.
- MIYATA, M., WANG, L., FUKUMURA, T. Localizing the replication origin region on the physical map of the *Mycoplasma capricolum* genome. **J. Bacteriol.**, Washington, v.175, n.3, p.655-660, 1993.
- MOLLER, B.R., TAYLOR-ROBINSON, D., FURR, P.M. Serological evidence implicating *Mycoplasma genitalium* in pelvic inflammatory disease. **Lancet**, London, v.1, n.8386, p.1102-1103, 1984.
- MONTEIRO, P.B., TEIXEIRA, D.C., PALMA, R.R., GARNIER, M., BOVE, J.M., RENAUDIN, J. Stable transformation of the *Xylella fastidiosa* citrus variegated chlorosis strain with *oriC* plasmids. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.67, n.5, p.2263-2269, 2001.

- MORAN, C.P.J., LANG, N., LEGRICE, S.F.J., LEE, G., STEVENS, M.
Nucleotide sequence that signals the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. **Mol. Gen. Genet.**, Berlin, v.186, p.339-346, 1982.
- MORIYA, S., ATLUNG, T., HANSEN, F.G., YOSHIKAWA, H., OGASAWARA, N.
Cloning of an autonomously replicating sequence (ars) from the *Bacillus subtilis* chromosome. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v.6, n.3, p.309-315, 1992.
- MORIYA, S., FIRSHEIN, W., YOSHIKAWA, H., OGASAWARA, N. Replication of a *Bacillus subtilis* oriC plasmid *in vitro*. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v.12, n.3, p.469-478, 1994.
- MUSHEGIAN, A.R., KOONIN, E.V. A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v.93, n.19, p.10268-10273, 1996.
- NOCARD, E.; ROUX, E. R. Le microbe de la peripneumonie. **Ann. Inst. Pasteur**, Paris, v.12, p.240, 1898.
- NORLANDER, T., NILSSON, L., RIVERO, C., MIDVEDT, T., LIDEGREN, M., CARLSOO, B., STIERNA, P. Effects of experimental *Mycoplasma pulmonis* infection on sensory neuropeptides and airway mucosa in the rat. **Eur. Respir. J.**, Saint Sheffield, v.10, n.10, p.2334-2342, 1997.
- PETTERSSON, B., LEITNER, T., RONAGHI, M., BOLSKE, G., UHLEN, M., JOHANSSON, K.E. Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster as determined by sequence analysis of the 16S rRNA genes from the two rRNA operons. **J. Bacteriol.**, Washington, v.178, n.14, p.4131-4142, 1996.
- QIN, M.H., MADIRAJU, M.V., RAJAGOPALAN, M. Characterization of the functional replication origin of *Mycobacterium tuberculosis*. **Gene**, Amsterdam, v.233, n.1/2, p.121-130, 1999.
- RAZIN, S. Mycoplasma taxonomy and ecology. In: MANILOFF, J., MCELHANEY, R.N., FINCH, L.R., BASEMAN, J.B., eds. **Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis**. Washington: ASM Press, 1992. v.1, p.3-22.

- RAZIN, S., YOGEV, D., NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, Washington, v.62, n.4, p.1094-1156, 1998.
- REDDY, S.P., RASMUSSEN, W.G., BASEMAN, J.B. Isolation and characterization of transposon Tn4001-generated, cytoadherence-deficient transformants of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, Amsterdam, v.15, n.4, p.199-211, 1996.
- RENAUDIN, J., BOVE, J.M. Plasmid and viral vectors for cloning and expression in *Spiroplasma citri*. In: TULLY, J.G., RAZIN, S., eds. **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**. San Diego: Academic Press, 1996. v.1, p.167-178. (Molecular characterization).
- RENAUDIN, J., MARAIS, A., VERDIN, E., DURET, S., FOISSAC, X., LAIGRET, F., BOVE, J.M. Integrative and free *Spiroplasma citri* oriC plasmids: expression of the *Spiroplasma phoeniceum* spiralin in *Spiroplasma citri*. **J. Bacteriol.**, Washington, v.177, n.10, p.2870-2877, 1995.
- REYRAT, J.M., PELICIC, V., GICQUEL, B., RAPPUOLI, R. Counterselectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. **Infect. Immun.**, Washington, v.66, n.9, p.4011-4017, 1998.
- ROBERTS, M.C., KENNY, G.E. Conjugal transfer of transposon Tn916 from *Streptococcus faecalis* to *Mycoplasma hominis*. **J. Bacteriol.**, Washington, v.169, n.8, p.3836-3839, 1987.
- RUEPP, A., SOPPA, J. Fermentative arginine degradation in *Halobacterium salinarum* (formerly *Halobacterium halobium*): genes, gene products, and transcripts of the *arcRACB* gene cluster. **J. Bacteriol.**, Washington, v.178, p.4942-4947, 1996.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B., ERLICH, A. Primer-directed enzymatic amplification of

- DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, Washington, v.239, p.487-491, 1988.
- SANO, K., MIYATA, M. The *gyrB* gene lies opposite from the replication origin on the circular chromosome of *Mycoplasma capricolum*. **Gene**, Amsterdam, v.151, n.1/2, p.181-183, 1994.
- SHINE, J., DALGARNO, L. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to non-sense triplets and ribosome binding sites. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v.71, p.1342-1346, 1974.
- SIMEKA, J.W., DAVIS, J.K., DAVIDSON, M.K., ROSS, S.E., STADLANDER, C.T.K.-H., CASSEL, G.H. Mycoplasma diseases of animals. In: MANILOFF, J., MCELHANEY, R.N., FINCH, L.R., BASEMAN, J.B., eds. **Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis**. Washington: ASM Press, 1992. v.1, p.391-416.
- SMITH, D.G., RUSSELL, W.C., INGLEDEW, W.J., THIRKELL, D. Hydrolysis of urea by *Ureaplasma urealyticum* generates a transmembrane potential with resultant ATP synthesis. **J. Bacteriol.**, Washington, v.175, n.11, p.3253-3258, 1993.
- SOMERSON, N.L., WALLS, B.E., CHANOCK, R.M. Hemolysin of *Mycoplasma pneumoniae*: tentative identification as a peroxide. **Science**, Washington, v.150, n.693, p.226-228, 1965.
- SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J. Mol. Biol.**, Sidcup, v.98, p.503-517, 1975.
- STANLEY, P., KORONAKIS, V., HUGUES, C. Acylation of *Escherichia coli* Hemolysin: A Unique Protein Lipidation Mechanism Underlying Toxin Function. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, Washington, v.62, n.2, p.309-333, 1998.
- STARK, W.M., BOOCOCK, M.R., SHERRATT, D.J. Catalysis by site-specific recombinases. **Trends Genet.**, Amsterdam, v.8, p.423-439, 1992.

- STEFFEN, M.J., EBERSOLE, J.L. Secretory immune responses to *Mycoplasma pulmonis*. **Infect. Immun.**, Washington, v.60, n.2, p.337-344, 1992.
- SUGIMURA, K., OHNO, T., AZUMA, I., YAMAMOTO, K. Polymorphism in genes for the enzyme arginine deiminase among *Mycoplasma* species. **Infect. Immun.**, Washington, v.61, n.1, p.329-331, 1993.
- SWING, S.P., DAVIS, J.K., EGAN, M.L. *In vitro* effects of *Mycoplasma pulmonis* on murine natural killer cell activity. **Lab. Anim. Sci.**, Cordova, v.45, n.4, p.352-356, 1995.
- TAYLOR, R.R., VARSANI, H., MILES, R.J. Alternatives to arginine as energy sources for the non-fermentative *Mycoplasma gallinarum*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v.115, n.2/3, p.163-167, 1994.
- TAYLOR-ROBINSON, D. The Harrison Lecture. The history and role of *Mycoplasma genitalium* in sexually transmitted diseases. **Genitourin. Med.**, London, v.71, n.1, p.1-8, 1995.
- TAYLOR-ROBINSON, D., FURR, P.M. Genital mycoplasma infections. **Wien. Klin. Wochenschr.**, Wien, v.109, n.14-15, p.578-583, 1997.
- TAYLOR-ROBINSON, D., GILROY, C.B., HAY, P.E. Occurrence of *Mycoplasma genitalium* in different populations and its clinical significance. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.17, suppl.1, p.S66-S68, 1993.
- TULLY, J.G. Cloning and filtration techniques for mycoplasmas. In: RAZIN, S., TULLY, J.G., eds. **Methods in mycoplasmaology**. San Diego: Academic Press, 1983. v.1, p.173-177, 1983.
- TULLY, J.G., BOVE, J.M., LAIGRET, F., WHITCOMB, R.F. Revised taxonomy of the class *Mollicutes*: proposed elevation of a monophylogenetic cluster of arthropod-associated mollicutes to ordinal rank (*Entomoplasmatales* ord. nov.), with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology (*Entomoplasmataceae* fam. nov.) from helical species (*Spiroplasmataceae*), and emended descriptions of the order *Mycoplasmatales*, family

- Mycoplasmataceae*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Washington, v.43, p.378-385, 1993.
- TULLY, J.G., TAYLOR-ROBINSON, D., COLE, R.M., ROSE, D.L. A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract. **Lancet**, London, v.1, n.8233, p.1288-1291, 1981.
- VOELKER, L.L., DYBVIG, K. Gene transfer in *Mycoplasma arthritidis*: transformation, conjugal transfer of Tn916, and evidence for a restriction system recognizing AGCT. **J. Bacteriol.**, Washington, v.178, n.20, p.6078-6081, 1996.
- VOELKER, L.L., WEAVER, K.E., EHLE, L.J., WASHBURN, L.R. Association of lysogenic bacteriophage MAV1 with virulence of *Mycoplasma arthritidis*. **Infect. Immun.**, Washington, v.63, n.10, p.4016-4023, 1995.
- WANG, X., LUTKENHAUS, J. Characterization of the *ftsZ* gene from *Mycoplasma pulmonis*, an organism lacking a cell wall. **J. Bacteriol.**, Washington, v.178, n.8, p.2314-2319, 1996.
- WASHBURN, L.R., COLE, B.C., GELMAN, M.I., WARD, J.R. Chronic arthritis of rabbits induced by mycoplasmas. I. Clinical microbiologic, and histologic features. **Arthritis Rheum.**, New York, v.23, n.7, p.825-836, 1980.
- WASHBURN, L.R., COLE, B.C., WARD, J.R. Chronic arthritis of rabbits induced by mycoplasmas. II. Antibody response and the deposition of immune complexes. **Arthritis Rheum.**, New York, v.23, n.7, p.837-845, 1980.
- WEISBURG, W.G., TULLY, J.G., ROSE, D.L., PETZEL, J.P., OYAIKU, H., YANG, D., MANDELCO, L., SECHREST, J., LAWRENCE, T.G., VAN ETEN, J. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. **J. Bacteriol.**, Washington, v.171, n.12, p.6455-6467, 1989.
- WILLIAMS, M.V., POLLACK, J.D. A mollicute (mycoplasma) DNA repair enzyme: purification and characterization of uracil-DNA glycosylase. **J. Bacteriol.**, Washington, v.172, n.6, p.2979-2985, 1990.

- WILLIAMSON, D.L., RENAUDIN, J., BOVE, J.M. Nucleotide sequence of the *Spiroplasma citri* fibril protein gene. **J. Bacteriol.**, Washington, v.173, n.14, p.4353-4362, 1991.
- YE, F., RENAUDIN, J., BOVE, J.M., LAIGRET, F. Cloning and sequencing of the replication origin (*oriC*) of the *Spiroplasma citri* chromosome and construction of autonomously replicating artificial plasmids. **Curr. Microbiol.**, Secaucus, v.29, n.1, p.23-29, 1994.
- YEE, T.W., SMITH, D.W. *Pseudomonas* chromosomal replication origins: a bacterial class distinct from *Escherichia coli*-type origins. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v.87, p.1278-1282, 1990.
- ZAKRZEWSKA-CZERWINSKA, J., SCHREMPF, H. Characterization of an autonomously replicating region from the *Streptomyces lividans* chromosome. **J. Bacteriol.**, Washington, v.174, n.8, p.2688-2693, 1992.
- ZHENG, J., McINTOSH, M.A. Characterization of IS1221 from *Mycoplasma hyorhinis*: expression of its putative transposase in *Escherichia coli* incorporates a ribosomal frameshift mechanism. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v.16, n.4, p.669-685, 1995.
- ZHU, P.P., PETERKOFISKY, A. Sequence and organization of genes encoding enzymes involved in pyruvate metabolism in *Mycoplasma capricolum*. **Protein Sci.**, Woodbury, v.5, n.8, p.1719-1736, 1996.

ANEXOS

Tabela IV. Composição do meio SP-4 modificado (FREUND, 1983)

<i>Base autoclavada por 20 min a 120°C:</i>	
PPLO Broth	0,3 g
Peptona	0,4 g
Triptona	1 g
Vermelho de fenol 1%	0,3 mL
H ₂ O destilada qsp.	100 mL
Agar Noble (meio sólido) pH = 7,8	1 g
<i>Componentes adicionados esterilmente (filtrados em membrana de 0,2 µm):</i>	
Soro fetal bovino, inativado	17 mL
CMRL 1066 (Gibco BRL)	5 mL
Yeastolate 4%	8 mL
Glicose 50%	1 mL
Penicilina G (5.000.000 U/mL)	0,2 mL

Tabela V. Composição do meio Hayflick N modificado (FREUND, 1983)

<i>Base autoclavada por 20 min a 120°C:</i>	
PPLO Broth	2,0 g

DNA de espermato de salmão	0,02 g
Vermelho de fenol 1%	0,3 mL
H ₂ O destilada qsp.	100 mL
Agar Noble (meio sólido)	1 g
pH = 8,0	

Componentes adicionados esterilmente (filtrados em membrana de 0,2 µm):

Soro de cavalo, inativado	20 mL
Extrato de Levedura 25%	10 mL
Isovitalex TM (para <i>M. pulmonis</i>)	1 mL
Glicose 50%	1 mL
Penicilina G (5.000.000 U/ml)	0,2 mL

Tabela VI. Resultados da atividade hemolítica de células de micoplasma, representada pela diferença entre a D.O. inicial e a D.O. após a incubação (Δ D.O. a 600 nm) de uma suspensão de eritrócitos com diferentes quantidades de micoplasma (definidas em µg de proteína). A quantidade de eritrócitos lisados ao final da incubação é diretamente proporcional à Δ D.O. resultante. NT P5 : cultura de *M. pulmonis* não transformado com 5 passagens em meio de cultura ; NT P30 : cultura de *M. pulmonis* não transformado com 30 passagens; 7- pMPO5-DhlyA P20: cultura de *M. pulmonis* transformado com o vetor pMPO5- Δ hlyA com 20

passagens após a transformação; 7- pMPO5-DhlyA P30: cultura de *M. pulmonis* transformado com o vetor pMPO5- Δ hlyA em 30 passagens após a transformação.

Δ D.O. 600 nm					
ug proteína	NT P5	NT P30	7-pMPO5- Δ hlyA P20	7-pMPO5- Δ hlyA P30	<i>M. penetrans</i>
85,3		0,774			
78,8	0,719				0
73,75			0,920		
60					
52,5					
46,25				0,896	
42,6		0,925			
39,4	0,894				0
36,9			0,826		
30					
26,25					
23,1				0,706	
21,3		0,865			
19,7	0,822				
18,4			0,585		0
15					
13,1					
11,6				0,428	
10,7		0,523			
9,8	0,434				
9,2			0,361		0
7,5					
6,6					
5,3		0,110			
5,8				0,246	
4,9	0,090				0
4,6			0,1700		
3,75					
3,3					
2,7		0			
2,9				0,135	
2,4	0				

Tabela VII. Resultados da atividade hemolítica de células de micoplasma, representada pela diferença entre a D.O. inicial a 600 nm e a D.O. após a incubação de uma suspensão de eritrócitos com diferentes quantidades de micoplasma (definidas em µg de proteína). NT P5 : cultura de *M. pulmonis* não transformado em 5 passagens após o seu isolamento de camundongo infectado ; NT P24 : cultura de *M. pulmonis* não transformado em 24 passagens após o seu isolamento; 27.22 P24: cultura de *M. pulmonis* transformado com o vetor pMPO5- $\Delta hlyA$ em 24 passagens após a transformação selecionada após 15 passagens sem tetraciclina.

ug proteína	Δ D.O. 600 nm		
	NT P5	NT P21	27.22 P24
85,3		0,774	
78,8	0,719		
65,8			0,840
42,6		0,925	
39,4	0,894		
32,9			0,814
21,3		0,865	
19,7	0,822		
16,4			0,749

10,7		0,523	
9,8	0,434		
8,2			0,471
5,3		0,110	
4,9	0,090		
4,1			0,046
2,7		0	
2,4	0		
2,0			0,019
1,3		0	
1,2	0		
1,0			0,009